

Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie

Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

# Rolle des Zellwandintegritätswegs in *Aspergillus fumigatus* für Sensibilität und Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten - Analyse mittels mitochondrialer Morphologie als Stressmarker

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Dominik Ruf  
aus München  
im Jahr 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Johannes Wagener
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Frank Ebel Prof. Dr. Ludger Klein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Karl Dichtl
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	18.11.2021

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	7
2	Abkürzungsverzeichnis.....	9
3	Tabellenverzeichnis.....	9
4	Abbildungsverzeichnis.....	10
5	Einführung .....	11
5.1	Mit <i>Aspergillus fumigatus</i> assoziierte Erkrankungen .....	11
5.2	Taxonomie und asexueller Lebenszyklus von <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	11
5.3	Diagnostik und Therapie der invasiven Aspergillose .....	12
5.4	Die Zellwand von <i>A. fumigatus</i> .....	15
5.5	Der Zellwandintegritätsweg.....	18
5.6	Rho-GTPasen in <i>A. fumigatus</i> .....	19
5.7	Fusion und Fission: Die mitochondriale Dynamik .....	21
5.8	Die Pilzabwehr: Immunologische Mechanismen gegen <i>A. fumigatus</i> .....	22
5.9	Neutrophile Granulozyten als zentrales Element der Abwehr gegen <i>A. fumigatus</i> ..	26
5.10	Die Bestimmung der fungalen Überlebensrate: Eine methodische Herausforderung 29	
5.11	Zielsetzung .....	32
6	Material und Methoden.....	33
6.1	Vorbemerkung.....	33
6.2	Chemikalien und Enzyme.....	33
6.3	Geräte.....	33
6.4	Zellanzucht .....	34
6.4.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> .....	34
6.4.2	<i>Escherichia Coli</i> .....	39
6.5	Molekularbiologische Methoden.....	40
6.5.1	Isolierung genomischer DNA .....	40
6.5.2	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	40
6.5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
6.5.4	PCR-Aufreinigung.....	42
6.5.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	42
6.5.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	43
6.5.7	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. Coli</i> .....	43
6.5.8	Transformation in <i>E. Coli</i> .....	44

6.5.9	Plasmidisolation .....	44
6.5.10	Durchführung einer Colony-PCR .....	45
6.6	Herstellung von genetisch veränderten Pilzstämmen.....	45
6.6.1	Herstellung von Stämmen mit mitochondrialem GFP .....	46
6.6.2	Herstellung von Stämmen mit cytosolischem GFP .....	46
6.6.3	Herstellung neuer Klone der $\Delta\rho2+\rho2$ Komplementationsmutante.....	47
6.6.4	Herstellung der $\Delta\rho2+\rho2_{add3'}$ Komplementationsmutante .....	48
6.6.5	Klonierung von Kassetten für konditionelle Mutanten.....	52
6.6.6	Herstellung der konditionellen $\rho2_{teton}$ Mutante .....	54
6.6.7	Transformation in <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	56
6.7	Isolation humaner Granulozyten .....	59
6.8	Mikroskopie .....	60
6.9	Fotografie .....	60
6.10	Mikroskopische Vitalitätsbestimmung mittels mitoFLARE .....	61
6.10.1	Vorbereitung und experimentelle Bedingungen.....	61
6.10.2	Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie .....	61
6.11	Metabolisch-colorimetrische Vitalitätsbestimmung mittels Resazurin .....	62
6.12	Tüpfeltest .....	63
6.13	Radiärer Wachstumstest .....	64
6.14	Infektionsversuch in <i>Galleria melonella</i> .....	64
6.15	Bioinformatische Methoden .....	65
7	Ergebnisse.....	66
7.1	Etablierung eines neuen Assays zur Quantifizierung fungizider Effekte auf <i>A. fumigatus</i> Hyphen.....	66
7.1.1	Oxidativer Stress verursacht Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks. ....	66
7.1.2	Mitochondriale Fragmentierung korreliert mit Zelltod individueller Hyphen.....	70
7.1.3	Cytosolisches GFP ist mitochondrialem GFP als Marker fungalen Überlebens unterlegen.....	72
7.1.4	Granulozyten induzieren eine irreversible mitochondriale Fragmentierung .....	74
7.1.5	Lipopolysaccharide verstärken Granulozyten-induzierten Zelltod .....	79
7.1.6	Humanes Serum verstärkt Granulozyten-induzierten Zelltod .....	81
7.1.7	Antimykotika haben Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie .....	85
7.2	Die Zellwandstress-Mutanten $\Delta\rho2$ , $\Delta midA$ sowie die Deletionsmutante $\Delta\rho4$ zeigen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Granulozyten .....	87

7.3	Verhalten der Komplementationsmutante $\Delta\rho2+\rho2$ gegenüber Zellwandstress im Tüpfeltest und genetische Ursachensuche .....	88
7.3.1	$\Delta\rho2+\rho2$ zeigt eine erhöhte Zellwandstressresistenz im Tüpfeltest .....	88
7.3.2	Erstellung neuer $\Delta\rho2 + \rho2$ Komplementanten .....	90
7.3.3	Mit dem Vektor pJW649 transformierte Komplementanten-Klone ( $\Delta\rho2 + \rho2$ ) weisen unterschiedlich häufige Integrationen auf .....	90
7.3.4	Einzeln integrierte Klone pJW649 zeigen weiterhin erhöhte Zellwandstressresistenz .....	94
7.4	Erstellung der Komplementante $\Delta\rho2+\rho2_{add3'}$ und ihr Verhalten im Tüpfeltest ....	95
7.4.1	RNA-Sequenzierdaten für $\rho2$ zeigen starke Transkription der 3'-UTR.....	95
7.4.2	Erstellung des Komplementationsvektors pDR003.....	96
7.4.3	Mit dem Vektor pDR003 transformierte Komplementanten-Klone ( $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$ ) weisen unterschiedlich häufige Integrationen auf.....	97
7.4.4	Einzelne Integration von pDR003 führt zu reduzierter Zellwandstressresistenz auf Wildtypniveau im Tüpfeltest .....	99
7.5	Induktion einer konditionellen $\rho2$ -Mutante erhöht die Stressresistenz .....	100
7.5.1	Untersuchung der Resistenz gegenüber Zellwandstress im Tüpfeltest.....	100
7.5.2	Untersuchung der Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten .....	103
7.6	$\rho2_{teton}$ weist unter induzierten Bedingungen eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit auf .....	104
7.7	Die Virulenz der Deletionsmutante $\Delta\rho2$ ist reduziert in <i>Galleria melonella</i> .....	107
8	Diskussion .....	109
8.1	mitoFLARE als neue Methode zur Lebend-/Totdifferenzierung .....	109
8.1.1	Vergleich zu metabolisch-colorimetrischen Methoden .....	109
8.1.2	Vergleich zu Methoden basierend auf zugegebenen Färbesubstanzen.....	111
8.1.3	Vergleich zu Methoden basierend auf cytosolischer Fluoreszenz.....	111
8.1.4	Einsatz von mitoFLARE bei immunologischen Fragestellungen .....	112
8.1.5	Übertragbarkeit auf andere Pilzspezies .....	113
8.1.6	Limitationen von mitoFLARE .....	113
8.2	Der Zellwandintegritätsweg als Vermittler von Sensibilität und Resistenz gegenüber Immunzellen .....	115
8.3	Spielt Rho2 eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Zellwandstressantwort? ....	116
8.3.1	Funktion von Rho2 und Position im Zellwandintegritätsweg .....	116
8.3.2	Rolle von MidA und Bezug zu Rho2.....	120
8.3.3	Rolle der 3'-UTR von $\rho2$ für die Regulation des Promoters .....	120
8.3.4	<i>In vivo</i> Versuche .....	121

9	Publikationen .....	123
10	Affidavit.....	124
11	Danksagung .....	125
12	Literaturverzeichnis .....	126

## 1 Zusammenfassung

Die invasive Aspergillose, eine durch den pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ausgelöste Erkrankung, stellt eine zunehmende Bedrohung für Risikopatienten dar<sup>1-4</sup>. Sie gilt als die häufigste invasive Pilzerkrankung nach hämatopoietischer Stammzelltransplantation sowie nach solider Organtransplantation<sup>1,5,6</sup>. Seitens des Immunsystems spielen neutrophile Granulozyten in der Abwehr des frei in der Atemluft vorkommenden *A. fumigatus* die Hauptrolle<sup>1,7,8</sup>. Sie sind in der Lage, sowohl Sporen als auch Hyphen des Pilzes effektiv mit Hilfe verschiedener antifungaler Mechanismen zu bekämpfen<sup>1,7,8</sup>.

Wasserstoffperoxid ruft durch oxidativen Stress Änderungen in der mitochondrialen Morphologie in *A. fumigatus* hervor, welche mit Hilfe von GFP mit mitochondrialem Zielsignal sichtbar gemacht werden können<sup>9,10</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass diese Änderungen früh auftreten und klassifizierbar sind. Sehr ähnliche Veränderungen treten auch nach Einfluss humaner neutrophiler Granulozyten auf. Es wird mithilfe von Zeitreihen, Videoaufnahmen und Hinzunahme eines metabolisch-basierter Assays gezeigt, dass gewisse Änderungen in der Mitochondrienmorphologie irreversibel sind und sich damit zur Lebend-Tot-Differenzierung eignen. Damit stellt ein Kernpunkt dieser Arbeit die Entwicklung einer neuartigen Methode dar, welche die Vitalität von individuellen *A. fumigatus* Hyphen mikroskopisch bestimmen und quantifizieren lässt. Trotz Limitationen, wie einer teils nicht eindeutigen Zuordnung der beobachteten Morphologien in eine definitive Kategorie, stellt diese Methode eine Erweiterung der zur Verfügung stehenden Techniken dar und weist Vorteile gegenüber häufig angewandten metabolisch-colorimetrischen Methoden auf.

Zellwandstress wird in *A. fumigatus* maßgeblich über den sogenannten Zellwandintegritätsweg erkannt<sup>11</sup>. Mutanten, denen aufgrund von Gendeletion Bestandteile des Zellwandintegritätswegs fehlen, weisen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber charakteristischen Stressoren wie Caspofungin, Calcofluorweiß (CFW) oder Hitze auf<sup>11,12</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wird mittels der neu entwickelten Methode zur Lebend-Tot-Differenzierung via mitochondrialer Morphologie untersucht ob Stämme, denen durch Gendeletion Bestandteile des Zellwandintegritätswegs fehlen, eine geänderte Empfindlichkeit gegenüber

neutrophilen Granulozyten aufweisen. Es ergab sich dabei eine erhöhte Empfindlichkeit der Mutanten  $\Delta\rho2$ ,  $\Delta\rho4$  und  $\Delta midA$ , sowie eine gesteigerte Resistenz der komplementierten Mutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  sowohl gegenüber neutrophilen Granulozyten als auch gegenüber dem Zellwandstressor CFW.

Als Ursache für diese gesteigerte Resistenz wird eine Überexpression von  $\rho2$  vermutet. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass eine neu konstruierte konditionelle  $\rho2$ -Mutante unter induzierten Bedingungen ebenfalls eine gesteigerte Resistenz gegenüber Zellwandstress und neutrophilen Granulozyten aufweist. Eine Normalisierung des Phänotyps auf Wildtypniveau wird durch die Konstruktion einer am 3'-UTR erweiterten Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  erreicht, welche zusätzlich einzeln integriert hat.

Weitere wesentliche Erkenntnisse aus dieser Arbeit sind eine signifikant verringerte Wachstumsgeschwindigkeit der konditionellen  $\rho2$ -Mutante unter induzierten Bedingungen sowie ein signifikant reduziertes Überleben der  $\Delta\rho2$ -Mutante *in vivo* in der Bienenmade *Galleria melonella*.



## 2 Abkürzungsverzeichnis

ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
AMM	Aspergillus Minimal Medium
AM	Alveolarmakrophagen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CFW	Calcofluorweiß
CPA	Chronische Pulmonale Aspergillose
CR	Engl. Congo-Red
CS	Caspofungin
CWI	Engl. Cell Wall Integrity Pathway
EAA	Exogen-allergische Alveolitis
GFP	Engl. Green Fluorescent Protein
IA	Invasive Aspergillose
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
PAMP	Engl. Pathogen Associated Molecular Pattern
PMN	Engl. Polymorphonuclear Neutrophils
PRR	Pathogen Recognition Receptors
UTR	Untranslatierte Region

## 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	47
Tabelle 2	49
Tabelle 3	50
Tabelle 4	51
Tabelle 5	53
Tabelle 7	54

## **4 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	16
Abbildung 2	18
Abbildung 3	46
Abbildung 4	51
Abbildung 5	55
Abbildung 6	56
Abbildung 7	67
Abbildung 8	69
Abbildung 9	70
Abbildung 10	73
Abbildung 11	76
Abbildung 12	77
Abbildung 13	78
Abbildung 14	79
Abbildung 15	80
Abbildung 16	82
Abbildung 17	84
Abbildung 18	86
Abbildung 19	88
Abbildung 20	89
Abbildung 21	92
Abbildung 22	93
Abbildung 23	94
Abbildung 24	96
Abbildung 25	98
Abbildung 26	99
Abbildung 27	102
Abbildung 28	103
Abbildung 29	105
Abbildung 30	106
Abbildung 31	107

## 5 Einführung

### 5.1 Mit *Aspergillus fumigatus* assoziierte Erkrankungen

Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* zählt zu den opportunistischen Erregern<sup>1,13–15</sup>. Eine gefürchtete Form einer opportunistischen Infektion mit *A. fumigatus* ist die der invasiven Aspergillose (IA), deren Inzidenz weltweit ansteigt<sup>1–4</sup>. Als Risikogruppen gelten im Wesentlichen Patienten mit schweren Störungen des Immunsystems. Besonders gefährdete Gruppen sind Patienten nach hämatopoietischer Stammzelltransplantation (HSZT), solider Organtransplantation, Chemotherapie bei akuter Leukämie oder nach hochdosierter Gabe von Kortikosteroiden<sup>1,5,13,16,17</sup>. Die Letalität einer IA ist trotz adäquater Therapie sehr hoch, nach HSZT oder akuter Leukämie liegt sie bei 40-50%<sup>1,6,17</sup>. Die IA gilt als die häufigste invasive Pilzerkrankung nach HSZT bzw. nach solider Organtransplantation mit 43 bzw. 59% aller invasiven Pilzinfektionen noch vor der invasiven Candidose<sup>1,5,6,17,18</sup>. Andere von *A. fumigatus* ausgelöste oder mitverursachte Krankheitsbilder stehen im Zusammenhang mit allergischen Geschehen: Im Rahmen einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) oder einer exogen allergischen Alveolitis (EAA) begünstigen *Aspergillen* die Entstehung bzw. Exazerbation eines allergischen Asthmas<sup>1,16</sup>. Eine chronische pulmonale Aspergillose (CPA) sowie das Aspergillom treten typischerweise bei Patienten mit bestehender Lungenerkrankung wie COPD, Tuberkulose oder Sarkoidose auf und stellen eine nicht-invasive Besiedlung meist (durch die Grunderkrankung) vorgeformter Höhlen wie Granulome oder Bullae im Lungenparenchym dar<sup>19,20</sup>. Eine CPA wird oft als Rezidiv bzw. Exazerbation der jeweiligen Grunderkrankung verkannt<sup>16</sup> und kann in Einzelfällen durch pulmonale Hämorrhagien tödlich verlaufen<sup>16,20</sup>.

### 5.2 Taxonomie und asexueller Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus*

Die Gattung der *Aspergilli* umfasst mehr als 250 Arten<sup>21,22</sup>. *A. fumigatus* vermehrt sich typischerweise asexuell<sup>22</sup>. Der Pilz wächst in einem Geflecht fadenförmiger Hyphen, die durch Septen in Kompartimente unterteilte Zellverbände darstellen<sup>23,24</sup>. Zur asexuellen Vermehrung bildet *A. fumigatus* Sporenträger, sogenannte Konidiophoren aus, speziell differenzierte Hyphen, die in einer bläschenförmigen Auftreibung, der Vesica, enden<sup>22</sup>. Dort befinden sich flaschenförmige konidiogene Zellen, die sog.

Phialiden<sup>22</sup>. Aus den Phialiden entstehen durch Knospung viele Sporen, auch Konidien genannt<sup>22</sup>.

Konidien sind 2-3 µm große Dauerformen des Pilzes<sup>22</sup>. Sie weisen eine erstaunliche Resistenz gegenüber den meisten Umwelteinflüssen wie Hitze, Frost, Trockenheit oder auch saurer bzw. alkalischer Umgebung auf und sind in der Lage, viele Jahre auch unter widrigen Bedingungen zu überleben<sup>15,25,26</sup>. Sie besitzen eine schützende Oberfläche, welche neben dem Hydrophobin RodA eine darunterliegende Schicht bestehend aus dem Farbstoff Melanin enthält<sup>27</sup>. Die rauchgrüne Farbe des Melanins war namensgebend für den Organismus. Sobald diese sogenannten ruhenden Sporen ihre Stoffwechselaktivität aufnehmen, beginnen sie anzuschwellen<sup>22</sup>. Aus diesen geschwollenen Sporen beginnen dann erst an einer, später oft auch an der gegenüberliegenden Seite, Keimschläuche auszuwachsen: Man spricht nun vom Keimling<sup>22</sup>. Diese knospenartigen Austriebe wachsen weiter und beginnen sich durch Septen in Kompartimente zu unterteilen<sup>23,24</sup>. Die Unterteilung mittels Septen stellt eine Strategie dar, den Rest einer Hyphe zu retten, sollte ein einzelnes Kompartiment durch Stressoren irgendeiner Art beschädigt werden: Bei einer Lyse einzelner Kompartimente beobachtet man einen Verschluss bestehender Poren in den angrenzenden Septen<sup>23,24,28</sup>. Im nun erreichten Hyphenstadium ist der asexuelle Lebenskreislauf von *A. fumigatus* geschlossen. 2009 wurde nachgewiesen, dass *A. fumigatus* zusätzlich auch einen sexuellen Lebenszyklus aufweist<sup>29,30</sup>. Dieser unterliegt jedoch sehr speziellen Bedingungen und spielt neben dem asexuellen Lebenszyklus vermutlich eine untergeordnete Rolle<sup>29,31</sup>.

### 5.3 Diagnostik und Therapie der invasiven Aspergillose

Aufgrund der hohen Letalität kommt der rechtzeitigen Diagnosestellung der invasiven Aspergillose eine große Bedeutung zu<sup>13</sup>. Um eine IA zu diagnostizieren, wurden aus einer Zusammenschau der einschlägigen Literatur die drei Ebenen der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer IA „bewiesen“, „wahrscheinlich“ und „möglich“ definiert<sup>1,14,32,33</sup>. Zum Beweis einer IA benötigt man die histopathologische Dokumentation einer Infektion und den positiven kulturellen Nachweis von Wachstum aus einer normalerweise sterilen Probe<sup>14</sup>. Eine IA kann zudem als bewiesen gelten, wenn trotz negativem kulturellen Nachweis eindeutig Hyphen im histopathologischen

Präparat nachgewiesen werden<sup>1,14</sup>. Als „wahrscheinlich“ gilt eine IA bei der Erfüllung von drei Kriterien: Vorliegende Immunsuppression oder Immunschwäche irgendeiner Art, klinische Symptome oder Zeichen (beispielsweise in der Bildgebung) und mikrobiologische Evidenz<sup>14</sup>. Anstatt eines kulturellen Nachweises können auch indirekte Nachweismethoden wie der sogenannte Galaktomannan- (s.u.) oder  $\beta$ -Glucan-Assay die Diagnose einer IA wahrscheinlich machen, wenn ausreichend übrige Evidenz (etwa passende Klinik oder Bildgebung) vorhanden ist<sup>1,14</sup>.

Die kulturelle Anzucht von *A. fumigatus* erfolgt auf Pilzmedien wie Sabouraud-Dextrose-Agar oder BHI-Medium, Wachstum auf Bakterien-Agar wie Blut-, Kochblut- oder McConkey-Agar ist jedoch prinzipiell möglich<sup>34,35</sup>. Die kulturelle Anzucht ist wertvoll zur Unterscheidung einer IA von anderen invasiven Pilzinfektionen (sog. Speziesnachweis)<sup>13,14</sup>, weist jedoch leider eine niedrige Sensitivität von <30% auf<sup>1,35</sup>. Methoden der Wahl zur Probengewinnung sind die bronchoalveoläre Lavage (BAL)<sup>14,33</sup> bzw. ersatzweise auch provoziertes Sputum<sup>33</sup>, die transthorakale perkutane Nadelaspiration oder die videoassistierte thorakoskopische Biopsie<sup>14</sup>. Neben der Anzucht auf Pilzmedien ist auch eine mikroskopische bzw. histologische Untersuchung von BAL, Nadelaspirations- oder Biopsiematerial wertvoll<sup>1,14,35</sup>, da der Nachweis typischer, sich dichotom verzweigender, septierter Hyphen als Beweis für eine IA gilt<sup>14</sup>. Zum Nachweis nicht geeignet ist die Blutkultur, da sie fast immer falsch negativ ausfällt<sup>14,35</sup>.

Weitere etablierte diagnostische Methoden umfassen weiterhin die Bildgebung mittels Computertomografie<sup>13,14</sup> – als Zeichen einer invasiven Pilzerkrankung wie der IA gelten hierbei sogenannte Halo oder air-crescent Zeichen<sup>36,37</sup> – und indirekte serologische Methoden<sup>13,14</sup>. Unter Letzteren ist der sogenannte Galaktomannan-Assay von großem Stellenwert und weist eine höhere Sensitivität als der Nachweis via kultureller Anzucht auf<sup>13,14,35,38–43</sup>. Studien erbrachten dabei sehr gute Sensitivitätsraten des Galaktomannan-Assays von 67 bis 100% bei ebenfalls sehr guten Spezifitätsraten von 86 bis 99% bei neutropenen Patienten nach Chemotherapie oder HSZT<sup>1,44,45</sup>. Im Gegensatz hierzu erbrachten Studien weitaus niedrigere Sensitivitätsraten von 30% und weniger<sup>1</sup> beim Vorliegen von Faktoren wie fehlender Neutropenie<sup>46,47</sup>, eine bereits begonnene antifungale Therapie bzw. Prophylaxe<sup>14,41</sup>, vorbestehende hohe

Konzentrationen an Aspergillus-Antikörpern<sup>46,47</sup> oder in pädiatrischen Patientengruppen<sup>45</sup>. Der Grund hierfür ist vermutlich eine geringere vorliegende Antigenlast im Serum. Für falsch positive Ergebnisse gibt es ebenfalls eine Reihe an möglichen Ursachen – interessant ist die Beobachtung falsch positiver Ergebnisse bei der gleichzeitigen antibiotischen Therapie mit Piperacillin/Tazobactam<sup>48–50</sup>. Am häufigsten wird der Galaktomannan-Assay aus Serumproben durchgeführt, eine Testung von BAL-Flüssigkeit, Sputum oder Liquor ist aber prinzipiell möglich<sup>13,14,51,52</sup>. Der Stellenwert des Galaktomannan-Assays als möglicher Verlaufsparmeter mit Einfluss auf die Dauer und Art des Therapieregimes wird derzeit diskutiert<sup>14,43</sup>, es zeigt sich ein deutlicher prognostischer Wert abhängig von einem Anstieg bzw. eines starken Abfalls von Galactomannan im Serum unter Therapie<sup>43</sup>. Die Diagnostik einer invasiven Aspergillose mittels PCR aus Serum oder BAL-Flüssigkeit ist noch nicht ausreichend validiert und weist teils eine niedrige Sensitivität (bei Serumproben), teils eine niedrige Spezifität (bei BAL-Proben) auf<sup>1,53</sup>.

Für die medikamentöse Therapie der IA werden die drei Substanzklassen der Polyene, Azole und Echinocandine eingesetzt<sup>54</sup>. Polyene wie Amphotericin B wirken vermutlich einerseits als Amphotere über die Bindung von Lipiden der Zellmembran (vor allem Ergosterol) und die gleichzeitige Porenbildung in der Membran<sup>55</sup>. Als zweiter Wirkmechanismus wird eine extrazelluläre Aggregation von Amphotericin B gesehen, die einem Schwamm gleich Ergosterol der Zellmembran des Pilzes entzieht<sup>56</sup>. Azole wie Voriconazol wirken über die Inhibierung eines in die Ergosterolbiosynthese eingebauten Cytochrom-P450-Komplexes<sup>55</sup>. Echinocandine wie Caspofungin hingegen wirken auf die Pilzzellwand über eine Hemmung der  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase<sup>55</sup>. Für die Auswahl des richtigen Therapieregimes bei einer IA stehen nur wenige randomisierte kontrollierte Studien (RCT) zur Verfügung. Die größte RCT ermittelte Voriconazol als überlegen gegenüber deoxycholiertem Amphotericin B<sup>14,57</sup>. Liposomales Amphotericin B gilt dennoch als alternative Erstlinientherapie neben Voriconazol<sup>13,14</sup>. Bei unzureichendem Ansprechen der Therapie oder Kontraindikationen gegen die Erstlinientherapie mit Voriconazol kann eine Kombination mit liposomalem Amphotericin B, Caspofungin oder Micafungin bzw. eine Umstellung auf Posaconazol erwogen werden<sup>13,14</sup>. Für Hochrisikopatienten (vor allem die

prolongierte Neutropenie sowie Graft-versus-Host-disease<sup>58,59</sup>) wird eine prophylaktische Therapie mit dem mit Voriconazol verwandten Wirkstoff Posaconazol empfohlen<sup>13,14</sup>. Bei ungewöhnlichen Manifestationsorten einer IA, wie etwa einer durch *A. fumigatus* ausgelösten Endokarditis oder einer Osteomyelitis, wird aufgrund der größten Erfahrung mit der Substanz liposomales Amphotericin B empfohlen<sup>14</sup>.

Für Patienten mit lokalisierter pulmonaler IA oder mit pulmonalen Aspergillom kommt auch eine chirurgische Resektion des Infektherdes in Betracht, auch wenn es hierzu keine großangelegten Studien gibt<sup>13,14,35</sup>.

Nicht zuletzt bleibt zu betonen, dass außer der antifungalen medikamentösen Therapie sowie ggf. chirurgischen Maßnahmen die möglichst schnelle Rekonstitution des patienteneigenen Immunsystems eine hohe Priorität besitzt<sup>13,14</sup>. Diesbezüglich unterstützende Maßnahmen können beispielsweise das Umstellen, Reduzieren oder Pausieren immunsupprimierender Substanzen sowie die Gabe von G-CSF (Granulocyte – Colony Stimulating Factor) darstellen<sup>13,14,35</sup>. Für die Sondergruppe der Patienten mit chronischer Granulomatose wird eine Prophylaxe mit rekombinantem Interferon- $\gamma$  empfohlen<sup>13,60</sup>.

#### **5.4 Die Zellwand von *A. fumigatus***

Außerhalb der Zellmembran von *A. fumigatus* befindet sich die sogenannte Zellwand, eine Struktur, die vornehmlich aus Polymeren wie Chitin, Glucan, Galaktomannan sowie Galaktosaminogalaktan (GAG) aufgebaut ist<sup>12,27,61,62</sup>. Die Zellwandstruktur ist in allen Pilzarten hochkonserviert erhalten, wobei dennoch entscheidende Unterschiede zwischen einzelnen Pilzspezies existieren<sup>11</sup>. Chemisch gesehen besteht die Zellwand im Kern aus  $\beta$ -1,3-Glucan, welches mit Chitin quervernetzt ist<sup>55,63</sup>. Dieser Glucan-Chitin Kernkomplex ist kovalent gebunden an andere Polysaccharide deren Zusammensetzung je nach Pilzspezies sehr unterschiedlich ist. Bei *A. fumigatus* bestehen diese Polysaccharide der äußeren Schicht vornehmlich aus Galaktomannan,  $\alpha$ -1,3-Glucan sowie  $\beta$ -1,3-1,4-Glucan<sup>63</sup>. Besonders zu betonen ist aber, dass insbesondere die Mengenverhältnisse dieser einzelnen Komponenten untereinander in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen sehr schwankt<sup>63</sup>. Es handelt sich bei Zellwand von *A. fumigatus* also um eine plastische, sich ständig im Umbau befindliche

Struktur<sup>63</sup>. So ist es beispielsweise bisher nicht möglich gewesen, die Zusammensetzung der Zellwand bei Pilzhyphen *in vivo* zu charakterisieren, da bei Patienten mit invasiver Aspergillose nicht genügend Zellwandmaterial für zuverlässige Analysen gewonnen werden kann<sup>63</sup>.

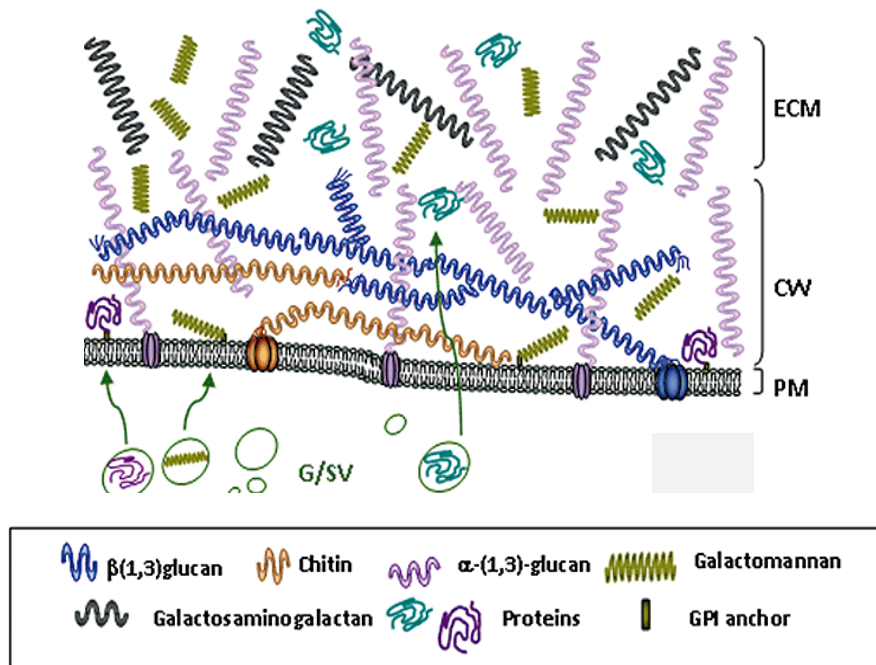


Abbildung 1: schematische Darstellung der Zellwand von *A. fumigatus* mit farblicher Markierung deren wesentlicher Bausteine.  $\beta$ -1,3-Glucan stellt dabei mengenmäßig den bedeutendsten Teil dar. Abbildung aus einer Publikation von Latgé et al 2010<sup>63</sup>

Gesteuert wird die Zellwandbiosynthese durch eine Vielzahl von Genen, wobei meist mehrere Synthesepoteine für jeden Zellwandbaustein vorhanden sind, wodurch sich ein redundantes System ergibt<sup>55</sup>. Erstaunlicherweise bildet eine Ausnahme die Synthese Fks1, die in *A. fumigatus* die einzige bekannte  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase ist, obwohl  $\beta$ -1,3-Glucan das am häufigsten vorkommende Zellwandpolymer darstellt<sup>55</sup>.

Bestandteile der Pilzzellwand werden im Allgemeinen als *pathogen associated patterns* (PAMPs) angesehen<sup>63,64</sup>, also als potentielle Auslöser einer Immunreaktion seitens des Wirts. Eine Vielzahl menschlicher Immunrezeptoren können Bestandteile der Zellwand von *A. fumigatus* erkennen, sie sind per Definition dann *pathogen recognition receptors* (PRRs). Namentlich sind dies u.a. TLR2<sup>65</sup> und TLR4<sup>66</sup> für Chitin und Dectin-1 für  $\beta$ -1,3-glucan<sup>67</sup>. Vor allem der Interaktion von Dectin-1 – zugehörig der



Gruppe der sogenannten C-Typ Lektin-Rezeptoren – mit  $\beta$ -1,3-Glucan wird dabei eine besondere Rolle zugesprochen<sup>67–70</sup>: Dectin-1 interagiert mit anderen PRRs beispielsweise der TLR-Gruppe und übt Effekte auf die Interleukinproduktion aus<sup>68</sup>. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob Dectin-1 insofern eine Schlüsselrolle zukommt, da es die Information mehrerer Rezeptorsignale und -signalwege integriert und zusammenführt<sup>68</sup>. Interessanterweise bindet Dectin-1 kein  $\alpha$ -1,3-Glucan<sup>63,71</sup>, was eine Theorie stützt, die in einer Hochregulierung von  $\alpha$ -1,3-Glucan ein Versuch des Pilzes sieht, sich vor dem Immunsystem zu tarnen<sup>27,72,73</sup>. In Konidienform kommt dem Protein RodA eine wesentliche Funktion in der Abschirmung von Zellwandbestandteilen wie dem  $\beta$ -1,3-Glucan zu<sup>25</sup>. Umgekehrt führt eine Behandlung mit Antimykotika der Substanzklasse der Echinocandine, welche die  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthese hemmen, paradoxerweise zu einer erhöhten Exposition von  $\beta$ -1,3-Glucan auf der Hyphenoberfläche<sup>74,75</sup>. In der konsekutiv erhöhten Immunantwort wird ein erheblicher Teil des Wirkmechanismus der Echinocandine gesehen, was die Rolle von  $\beta$ -1,3-Glucan als wichtiges PAMP unterstreicht<sup>64,75</sup>.

Insgesamt ist die Interaktion von Zellwand und Immunsystem hochkomplex und bisher nicht gut genug verstanden<sup>1,63,69</sup>. Die Plastizität der Zellwand, bisher unbekannte Co-Rezeptoren der bekannten PRRs und die Tatsache, dass gewisse PAMPs wie etwa  $\beta$ -1,3-Glucan abhängig von ihrer Polymerlänge gegensätzliche Antworten auslösen können, lassen es sehr schwierig erscheinen, einzelne PAMP-PRR-Interaktionen als die einzige oder hauptverantwortliche für eine Immunantwort identifizieren zu können<sup>63</sup>.

## 5.5 Der Zellwandintegritätsweg

Um Zellwandstress, ausgelöst beispielsweise durch erhöhte Temperatur oder direkt mit der Zellwand reagierende Stressoren wie Calcofluorweiß, Kongorot (CR) oder Caspofungin (CS) zu erkennen und darauf reagieren zu können, gibt es ein in vielen Pilzspezies gut konserviertes System an Signalproteinen, welches Zellwandintegritätsweg (CWI) genannt wird<sup>11</sup>.

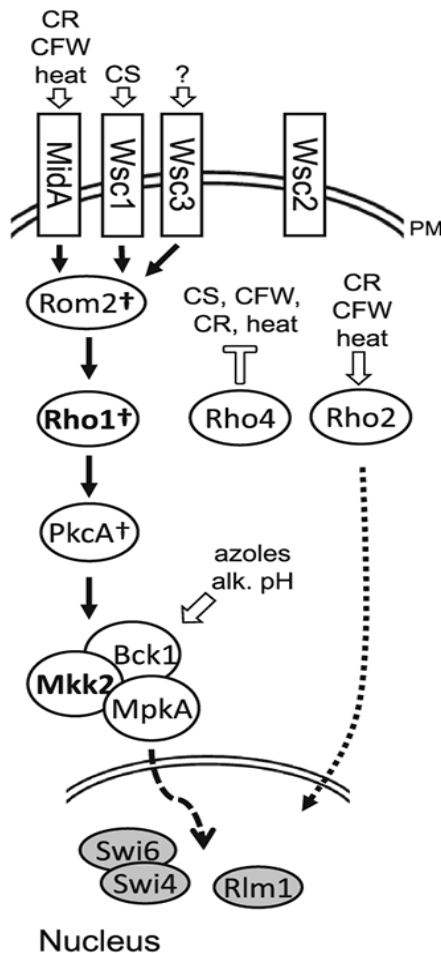


Abbildung 2: Schemazeichnung des Zellwandintegritätswegs in *A. fumigatus*. Die Deletion von MidA sowie auch die Deletion von Rho2 und Rho4 führt zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Kongorot (CR), Calcofluorweiß (CFW) und Hitze. Die Deletion von Wsc1 führt zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Caspofungin (CS). Abbildung aus einer Publikation von Dichtl et al. 2016<sup>58</sup>

Bei *A. fumigatus* wie auch den meisten anderen Pilzspezies besteht der CWI aus einer Signalkaskade, die an der Zellwandoberfläche an Zellwandstresssensoren beginnt und danach über guanine nucleotide exchange factors (GEFs), Rho-GTPasen, Proteinkinase C (PKC) oder mitogen activated protein kinase (MAPK)-Module Information an den Zellkern oder andere regulatorische Signalwege weiterleitet<sup>11</sup> (siehe Abbildung 2). Über die oberflächlichen Sensoren MidA sowie Wsc1 und Wsc3

wird Zellwandstress erkannt und an GEFs wie Rom2 integriert, welches einen Nukleotidaustausch bei RhoGTPasen wie Rho1 erwirkt<sup>11,76–78</sup>. Dessen Ziel ist (neben der  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase Fks1<sup>79</sup>) die Proteinkinase PkcA, die einem hochkonservierten MAPK-Modul aus den drei MAP-Kinasen Bck1, Mkk2 und MpkA vorgeschaltet ist<sup>55</sup>. Alle diese drei MAPK phosphorylieren sich nacheinander gegenseitig<sup>55,80</sup>, wobei schließlich MpkA in den Zellkern wandert, um dort wahrscheinlich diverse Transkriptionsregulatoren zu aktivieren<sup>55</sup>. Die Deletion einer dieser drei MAPK führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von MpkA und führt zu phänotypisch nahezu identischen Mutanten mit stark inhibiertem Wachstum und gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber vielen auf die Zellwand reagierenden Reagenzien<sup>55,80</sup>. Ein Verlust der oberflächlichen Sensoren über einzelne Deletion führt zu einer Empfindlichkeit gegenüber einzelnen Stressoren (siehe Abbildung 2), ansonsten aber zu einem allenfalls mäßig eingeschränkten Wachstum<sup>11</sup>. Eine Deletion mehrerer Sensoren bei der  $\Delta wsc1\Delta wsc3\Delta midA$ -Trippelmutante verstärkt die Phänotypen der Einzelmутanten erheblich was auf eine teilweise überlappende Funktion hinweist<sup>11</sup>. Die  $\Delta rom2$  Mutante ähnelt sehr stark der  $\Delta wsc1\Delta wsc3\Delta midA$ -Trippelmutante, was den GEF Rom2 als integratives Element all dieser Sensoren identifiziert<sup>11,81</sup>. Eine Deletion von *rho1* ist für *A. fumigatus* letal, weshalb diese GTPase als essentiell zu bezeichnen ist<sup>11</sup>. Eine Punktmutation im Gen für die ebenfalls essentielle Proteinkinase PkcA, die eine stark verminderten Aktivitätsrate von PkcA zur Folge hat, führt wiederum zu einem typischen CWI-Phänotyp mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber vielen Zellwandstressoren<sup>11,82</sup>.

## 5.6 Rho-GTPasen in *A. fumigatus*

Auch wenn deren genaue Rolle unklar bleibt, wird auch für die Rho-GTPasen Rho2 und Rho4 eine Beteiligung am CWI vermutet<sup>12</sup>. Monomere GTPasen des Cdc42/Rho Typs sind in Pilzen wie auch der Tierwelt hochkonserviert<sup>83</sup>. Sie erfüllen dabei mehrere Funktionen in vielen eukaryoten Zellen<sup>84</sup>: Sie sind wesentlich an der zellmembrannahen Aktin-Assemblierung beteiligt und werden deshalb auch für die Prozesse der Exo- und Endozytose benötigt<sup>85–87</sup>. Ferner wurde eine Rolle bei der Genese von reaktiver Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase<sup>88,89</sup>, sowie eine regulatorische Funktion auf wichtige Transkriptionsfaktoren wie etwa NFkB belegt<sup>90</sup>.

Bei Pilzen wurden Rho-GTPasen am besten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert und untersucht<sup>91</sup>. Sie erfüllen eine Art Schalterfunktion als Regulatoren für unter anderem Morphogenese und Entwicklung des Pilzes<sup>83</sup>. Dabei findet ein Aktivitätszyklus zwischen der aktivierten GTP-gebundenen und der inaktiven GDP-gebundenen Form statt<sup>12,91</sup>. GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) und GAPs (GTPase binding proteins) sind wichtige Kofaktoren dieses Zyklus<sup>12,83</sup>. RDIs (Rho dissociation inhibitors) stellen ein weiteres inhibitorisches regulatorisches Element dar<sup>83</sup>. Rho-GTPasen sind oft als Teile von Signalkaskaden wie etwa des Zellwandintegritätswegs oder der Ras - Cdc42 - Rho Kaskade beschrieben<sup>12,83,84</sup>. In *S. cerevisiae* sind insgesamt sechs verschiedene Rho-GTPasen identifiziert<sup>83</sup>. Cdc42 sitzt in einer Art Schlüsselposition eines großen Signalnetzwerks der Morphogenese<sup>83</sup>. Rho1 wird neben seiner Rolle bei der Aktinsynthese als Regulatoreinheit der  $\beta$ -Glucan-Synthase eine große Bedeutung bei der Zellwandsynthese zugesprochen<sup>11,76,83,91</sup> und ist damit auch Teil des Zellwandintegritätswegs (siehe oben). Rho3 erfüllt eine wichtige Rolle in der Zellteilung der Hefe via Knospenbildung<sup>83</sup>. Cdc42, Rho1 und Rho3 sind essentielle Proteine in *S. cerevisiae*<sup>83</sup>. Die Funktionen der übrigen drei nicht essentiellen Rho-GTPasen Rho2, Rho4 und Rho5 sind nicht abschließend geklärt<sup>83</sup>.

In Fadenpilzen sind Rho-GTPasen deutlich weniger gut untersucht als im Modellorganismus *S. cerevisiae*<sup>83</sup>. Rho1 ist wie in 5.5 bereits erwähnt essentiell in *A. fumigatus* und Teil des Zellwandintegritätswegs. Cdc42 besitzt in Fadenpilzen interessanterweise ein weiteres Analogon namens Rac1<sup>83</sup>. Beide Proteine erfüllen ähnliche Funktionen und sind teilweise redundant, weshalb nur eine Deletion beider Gene letal ist<sup>83</sup>. Über Rho2 ist wenig bekannt. Eine Deletion von *rho2* oder von *rho4* führt zu einer deutlich gesteigerten Sensibilität gegenüber typischen Zellwandstressoren und Wachstumsbedingungen (CFW, CR, Hitze)<sup>12</sup>, weshalb beide Proteine auch dem Zellwandintegritätsweg zugeordnet werden<sup>12,83</sup>. Die genaue Rolle von beiden Rho-GTPasen im CWI ist aber unklar<sup>11</sup>. Rho4 besitzt jedenfalls eine andere, entscheidende Funktion: Es ist – durch die Steuerung des Zytoskeletts in Form von Aktin-Ringen - für die Ausbildung von Septen in den Hyphen verantwortlich<sup>11,83</sup>.  $\Delta rho4$  weist nahezu keine Septen auf, was für sich gestellt bereits eine Erklärung für

eine erhöhte Vulnerabilität der Mutante ist. Die Deletion von Rho3 führt zu keinem offensichtlichen Phänotyp<sup>83</sup>, die Rolle dieses Proteins in Fadenpilzen ist unbekannt.

### **5.7 Fusion und Fission: Die mitochondriale Dynamik**

Mitochondrien sind sogenannte semi-autonome Zellorganellen mit eigenem Genom und eigener Proteinbiosynthese<sup>92</sup>. Die ATP-Synthese über die Atmungskette, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, die Produktion essenzieller Co-Faktoren für viele Enzyme<sup>92</sup>, die Synthese von Phospholipiden sowie die Apoptose sind dabei nur einige Beispiele für zelluläre Prozesse, an denen Mitochondrien beteiligt sind<sup>92,93</sup>. Die klassische, auch heute noch in vielen Lehrbüchern zu findende Vorstellung von Mitochondrien als bohnenförmige, getrennte Zellorganismen stammt aus der frühen Zeit der Elektronenmikroskopie, als man Mitochondrien nur als Schnittbilder erfassen konnte<sup>92</sup>. In den 1980er Jahren wurde im Zeitalter des *live cell imaging* deutlich, dass Mitochondrien vielmehr als dynamische Organelle zu verstehen sind, die in der Lage sind, große intrazelluläre Netzwerke aufzubauen<sup>92,94</sup>. In eukaryotischen Zellen, und so auch in Hyphen und Konidien von *A. fumigatus*, führen Mitochondrien zu diesem Zweck kontinuierlich zwei gegensätzliche Prozesse aus: Die sogenannte Fusion und Fission<sup>92,95</sup>. Dabei müssen die mitochondrialen Doppelmembranen sich ständig trennen und wieder verschmelzen<sup>92</sup>. Die Aktivität von Fusion und Fission geschieht gesteuert und ist durch eine Vielzahl von Genen reguliert<sup>92,95</sup>. Ein klassischer Modellorganismus für die mitochondriale Dynamik ist dabei der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*, der Fusions- und Fissionsapparat ist jedoch konserviert erhalten in den meisten eukaryotischen Zellen<sup>9,92,95</sup>. In jüngerer Vergangenheit rückten Säugetierzellen vermehrt ins Zentrum der Mitochondrienforschung<sup>95</sup>. Die Regulation der mitochondrialen Dynamik scheint dabei eine große Bedeutung bei wichtigen zellulären Prozessen wie bspw. der Apoptose, der Autophagie, der mitochondrialen Qualitätskontrolle oder bei der Stressresistenz zu haben<sup>92,95</sup>.

Beim Pilz deutet vieles darauf hin, dass die beiden Proteine Fzo1 und Mgm1 als Kernkomponenten der Fusion zu verstehen sind<sup>92,96–98</sup>. Sie sind Proteine aus der großen Gruppe der Dynamine, die bekannterweise als Mediatorproteine vieler Umbauprozesse an Zellmembranen beteiligt sind<sup>92</sup>. Bei den Deletionsmutanten  $\Delta fzo1$  und  $\Delta mgm1$  ist eine sogenannte Fragmentierung der Mitochondrien festzustellen<sup>96,99</sup>,

die darauf beruht, dass eine Fusion der Mitochondrien nicht mehr möglich ist. Bei der mitochondrialen Fission hingegen übernimmt im Modellorganismus *S. cerevisiae* das Protein Dnm1 eine Schlüsselrolle<sup>100,101</sup>: Mit seinen beiden Partnerproteinen Fis1 und Mdv1 initiiert es den Prozess der Fission<sup>92,102,103</sup>. Die Deletionsmutante  $\Delta dnm1$  zeigt dementsprechend stark vernetzte, sehr lange Mitochondrien<sup>100,101</sup>.

Beim Menschen und höherentwickelten Säugetieren ist die Situation komplexer und insgesamt noch unzureichend erforscht. Zwar existieren auch im Menschen konservativ erhaltene Teile des Fusions- und Fissionsapparats wie das Mgm1-Analagon OPA1, die Fzo1-Analoga Mfn1/2 oder das Dnm1-Analagon Drp1, es wurden jedoch viele weitere Mediator- und Effektorproteine der mitochondrialen Dynamik identifiziert, die in *S. cerevisiae* keine Entsprechung haben<sup>95</sup>. Beim Menschen sind einige neurologische Erkrankungen mit Defekten der mitochondrialen Fusion und Fission assoziiert<sup>95,104</sup>: Bei der autosomal dominanten Optikusatrophie findet sich beispielsweise ein Defekt von *OPA1*, bei der Erkrankung Charcot-Marie-Tooth (Typ2a) von *Mfn2*<sup>92,95</sup>. Weiterhin wird der Fusion und Fission auch eine Rolle bei M. Parkinson zugesprochen, das *Parkin*-Gen beeinflusst die mitochondriale Dynamik und spielt eine Rolle beim Abbau von Mitochondrien<sup>95,104</sup>. Bei M. Alzheimer wird eine mitochondriale Dysfunktion und Fragmentierung beobachtet, vermutlich mitverursacht durch eine S-Nitrosylation von Drp1<sup>105</sup>.

## **5.8 Die Pilzabwehr: Immunologische Mechanismen gegen *A. fumigatus***

*A. fumigatus* ist ein Saprophyt und kommt somit in der Umwelt vor allem auf totem Pflanzenmaterial vor<sup>1,106</sup>. Konidien von *A. fumigatus* sind deshalb in der freien Natur in der Atemluft enthalten und gelangen somit in die Luftwege<sup>1,107</sup>. Die häufigsten Eintrittspforten für eine invasive Aspergillose stellen somit die unteren Atemwege sowie die Nasennebenhöhlen dar<sup>14</sup>. In den Luftwegen stützt sich die unmittelbare Immunabwehr vor allem auf das angeborene Immunsystem<sup>15</sup> und hierbei im Wesentlichen auf vier Säulen:

Erstens gibt es eine anatomische Barriere in Form von a) dem Alveolarepithel und b) des Flimmerepithels<sup>1,108,109</sup>. Die Rolle des Alveolarepithels im Menschen ist noch weithin unklar bzw. es existieren widersprüchliche Forschungsergebnisse<sup>1</sup>, es wird

jedoch eine Phagozytose von Konidien<sup>110</sup> und eine folgende Ausschüttung diverser Zytokine wie Interleukin Typ 8 (Il-8), TNF- $\alpha$  oder  $\beta$ -Defensine als Zeichen der Rekrutierung immunologischer Effektorzellen beobachtet<sup>7</sup>. Im Tiermodell ist häufig eine Penetration des Epithels durch Hyphen von *A. fumigatus* zu beobachten<sup>111</sup>. Es wird in diesem Zusammenhang auch diskutiert, ob von Epithelzellen internalisierte Konidien einen Infektfokus für eine invasive Aspergillose darstellen können<sup>112</sup>. Wie viele andere Luftpartikel auch beseitigen Zellen des Flimmerepithels Konidien von *A. fumigatus* über den Zilienschlag retrograd aus den Luftwegen<sup>1,113</sup>. Jedoch wird hierbei eine mögliche toxische Wirkung von Konidienbestandteilen auf das Epithel wie auch eine mögliche direkt inhibitorische Wirkung auf die Zilienaktivität vermutet<sup>114</sup>.

Zweitens existiert eine humorale Abwehrkomponente in Form des Komplementsystems<sup>15</sup>. Mehrere Proteine, die in Verbindung mit der Komplementkaskade stehen, sind nachweislich in der Lage, an der Oberfläche von *A. fumigatus* sowohl in Hyphen- als auch in Konidienform zu binden<sup>15</sup> und damit vermutlich hauptsächlich als Opsonin zu wirken. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Protein PTX-3 zu, welches von Epithelzellen und Phagozyten freigesetzt wird<sup>1</sup>. Polymorphismen des *PTX-3*-Gens scheinen eine Rolle bei COPD-Patienten zu spielen<sup>115</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass *PTX-3*  $-/-$  Mäuse<sup>116</sup> wie auch *C5*  $-/-$  Mäuse<sup>82</sup> (ein anderer wesentlicher Faktor im Komplementsystem) eine signifikant höhere Vulnerabilität gegenüber einer invasiven Aspergillose unter experimentellen Bedingungen aufweisen.

Drittens stellen phagozytische Zellen eine weitere Komponente dar. Diese wird von vielen Autoren als besonders wichtig erachtet<sup>15,117</sup>. Alveolarmakrophagen (AM) sind eine auf das Milieu der Lunge ausgerichtete, spezialisierte Abwehrkomponente. AM als residente Zellen beginnen als eine der ersten Phagozyten, eingeatmete Konidien zu binden und durch Endozytose in sich aufzunehmen<sup>1,7,15</sup>. Erstaunlicherweise erfolgt das Töten der Pilzsporen dann erst nach einer Verzögerung von einigen Stunden, nachdem die internalisierten Konidien bereits angeschwollen sind<sup>118,119</sup>. Dieses Phänomen könnte darauf zurückgeführt werden, dass ruhende Sporen eine Schicht maßgeblich bestehend aus dem Protein RodA besitzen, der immunogene Zellwandbestandteile wie die über den Dectin-1-Weg erkannten  $\beta$ -Glucane abschirmt, bis es zu einem

Anschwellen der Konidien kommt<sup>25,120</sup>. Dies und weitere Hinweise<sup>15</sup> legen den Schluss nahe, dass die Bekämpfung von *A. fumigatus* im Konidienstadium in AM maßgeblich auf nicht-oxidativen Mechanismen beruht<sup>1,15</sup>. Im Gegensatz dazu scheint jedoch ein Defekt der NADPH-Oxidase zu einer eingeschränkten Abtötungsrate von Konidien in AM zu führen<sup>119</sup> – vermutlich also spielen oxidative und nicht-oxidative Mechanismen zusammen<sup>1,73,121</sup>. Interessanterweise scheinen dennoch nicht wenigen Konidien die Auskeimung und das Wachstum bis hin zum Hyphenstadium zu gelingen<sup>15</sup>. Die Neutropenie wird als Hauptrisikofaktor der invasiven Aspergillose angesehen<sup>1</sup>. Daher ist es ohne Zweifel<sup>1</sup>, dass neutrophilen Granulozyten die wesentliche Aufgabe der zweiten, entscheidenden Welle in der zellulären Immunabwehr gegen *A. fumigatus* zukommt um überlebende Keimlinge und Hyphen zu töten<sup>7,15</sup>. Es wurde gezeigt, dass die für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wichtigen Chemokine CXL1 und CXL2 in großer Menge von AM produziert werden<sup>7</sup>. Da in dieser Dissertation die Wirkung von neutrophilen Granulozyten auf Hyphen von *A. fumigatus* untersucht wird, ist ihnen ein gesondertes Kapitel gewidmet. In einer weiteren, im Zeitverlauf nach dem Eintreffen der neutrophilen Granulozyten einzuordnenden Welle von Abwehrzellen, ist die Rekrutierung von zusätzlichen Effektorzellen wie eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, CCR2+ Monozyten und deren Abkömmlinge, dendritischen Zellen (DC), sowie natürlichen Killerzellen (NK) und Blutplättchen zu beobachten<sup>1</sup>. Eosinophile Granulozyten und Mastzellen haben eine wesentliche Rolle bei der ABPA und tragen zur Entstehung bzw. Verschlechterung eines Asthma bronchiale bei<sup>7</sup>. Bei der invasiven Aspergillose scheinen sie eine untergeordnete Rolle zu spielen<sup>7</sup>, da Mastzellen nicht in der Lage sind, durch Ausschüttung ihrer Granula das Pilzwachstum negativ zu beeinflussen<sup>7</sup>. Es konnte jedoch eine antifungale Aktivität von eosinophilen Granulozyten in Form von Zytokinproduktion nachgewiesen werden<sup>122</sup>. Da eine vasale Invasion von *A. fumigatus* bei der invasiven Aspergillose zu beobachten ist<sup>123</sup>, kommt auch Blutplättchen eine mögliche Rolle in der Immunabwehr zu: Es wurde gezeigt, dass Granula von Thrombozyten *in vitro* in der Lage sind, die Zellwand von *A. fumigatus* zu verdauen<sup>124</sup>. NK sind in der Lage, die Effektivität von AM zu verstärken und scheinen auch neutrophile Granulozyten bei der Pilzabwehr zu unterstützen<sup>7,125</sup>. Mausmodelle konnten jedoch zeigen, dass NK wohl nicht essenziell sind, eine invasive Aspergillose zu verhindern<sup>7</sup>. CCR2+ Monozyten und DC kommen wahrscheinlich



mehrere Funktionen zu: Sie nehmen als phagozytische Zellen Konidien durch Endozytose auf und nehmen durch die Produktion vieler Zytokine und Chemokine an Rekrutierung und Verstärkung der Immunreaktion teil<sup>7,126</sup>. Hierbei wird auch eine Art Zwischenstellung zwischen angeborenen und adaptivem Immunsystem hauptsächlich in Form von TH1-Zellen diskutiert<sup>7,68</sup>.

Viertens spielt auch das adaptive Immunsystem in Form sowohl der CD8+ als auch der CD4+ T-Zellen eine Rolle bei der Abwehr gegen *A. fumigatus*<sup>1,127,128</sup>. Die T-Zell-Antwort im menschlichen Immunsystem ist komplex und soll hier nur oberflächlich behandelt werden. Am besten untersucht wurde hierbei die Rolle der CD4+ T-Helferzellen, aufgeteilt in Th1- und Th2-Zellen<sup>1,68</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass eine Transfusion *Aspergillus*-spezifischer CD4+ Zellen protektive Effekte auf den Verlauf einer invasiven Aspergillose im Rahmen einer hematopoetischen Stammzelltransplantation haben<sup>129,130</sup>. Somit wird angenommen, dass der T-Zell-Antwort des adaptiven Immunsystems insbesondere in Sondersituationen einer defekten angeborenen Immunantwort eine große Bedeutung zukommt<sup>1,131,132</sup>. Neben einer groben Einteilung in Th1- und Th2-assoziiierter Immunantwort spielen in den letzten Jahren immer mehr auch die T-Zell-Subpopulationen der Treg- (für T-regulatorische Zellen) und Th17-Zellen eine große Rolle. Th17-Zellen scheinen dabei mit Th1-Zellen synergistisch zu wirken und über das proinflammatorische Interleukin-2 aktiviert zu werden<sup>1,133</sup>, sie werden zudem mit der Aktivierung von Granulozyten assoziiert<sup>134</sup>. Die genaue Rolle von Th-17 Zellen in der Anti-*Aspergillus*-Immunreaktion bleibt jedoch bisher weitgehend unklar<sup>1</sup>. Unstrittig ist jedoch eine verstärkende Rolle der Th-17 Zellen bei chronischen und allergischen Pilzerkrankungen wie dem Asthma bronchiale, der ABPA oder der CPA<sup>1,135</sup>. Auch Treg-Zellen wird eine große pathophysiologische Rolle bei chronischen und allergischen Pilzerkrankungen zugesprochen<sup>1,136</sup>. Treg-Zellen wirken als Immunmediatoren der Lunge und halten das Immunsystem im Gleichgewicht<sup>1</sup>. Eine Dysbalance der Immunantwort hin zu einer Th2-vermittelten Immunreaktion ist mit einer Neigung zu atopischen und allergischen Geschehen wie dem Asthma bronchiale assoziiert<sup>1</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass beim Asthma bronchiale die Zellverteilung von Treg-Zellen in der Lunge gestört ist<sup>136</sup>, womit also Treg-Zellen vermutlich eine protektive Rolle bei chronischen und allergischen Pilzerkrankungen zukommt.

Für die Rolle von Antikörpern bei der Immunabwehr gegen Pilzinfektionen des Menschen gibt es weder für *A. fumigatus* noch für invasive Pilzerkrankungen im Allgemeinen zuverlässige Daten<sup>1,68</sup>. Es wird vermutet, dass von den vielen klonalen Isotypen von aus Serum isolierten Antikörpern nur ein Bruchteil in der Lage ist, einen gewissen protektiven Effekt aufzuweisen<sup>68</sup>. Jedoch konnte im Mausmodell erfolgreich ein protektiver Effekt transferierter Antikörper gegen invasive Pilzerkrankungen ausgehend von *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* nachgewiesen werden<sup>68</sup>. Die Ziele solcher Antikörper stellen meist Zellwandbestandteile des Pilzes dar, wie etwa  $\beta$ -Glucan für *A. fumigatus* und *C. albicans* oder Mannotriose für *C. neoformans*<sup>68</sup>. Verschiedene Mechanismen scheinen hinter jenem protektiven Effekt zu stehen<sup>68</sup>: In erster Linie wird neben Opsonierung und Komplementaktivierung eine geänderte Immunantwort von T-Zellen vermutet<sup>68</sup>, da im Mausmodell eine deutliche Steigerung von Organisation, Formation und Inflammation entzündlicher Granulome mit Antikörpern behandelter Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden konnte<sup>68</sup>. Für *A. fumigatus* wurde eine Wachstumsinhibierung des Pilzes durch Anti- $\beta$ -Glucan Antikörper nachgewiesen<sup>137</sup>. Insgesamt besteht jedoch ein wissenschaftlicher Konsens, dass Antikörpern bei der Abwehr invasiver Pilzerkrankungen nur eine sehr untergeordnete Rolle zukommt<sup>1</sup>. Jedoch ist eine Th2-vermittelte erhöhte IgE-Produktion gegen *Aspergillus fumigatus* mitverantwortlicher Bestandteil in der Pathophysiologie der ABPA<sup>138</sup>.

## **5.9 Neutrophile Granulozyten als zentrales Element der Abwehr gegen *A. fumigatus***

Neutrophile Granulozyten machen prozentual den größten Anteil aller Immunzellen aus und werden zusammen mit den im Vergleich weniger zahlreich vertretenen Makrophagen als erste Abwehrreihe des Immunsystems bezeichnet<sup>139</sup>. Wie bereits erwähnt, gelten sie als die hauptverantwortliche Komponente in der Immunabwehr gegen *A. fumigatus*<sup>1,7,8</sup>: Die schwere Neutropenie gilt als Hauptrisikofaktor der invasiven Aspergillose<sup>1</sup>. Im Mausmodell sind von Neutropenie betroffene Tiere im Vergleich zu anderen Mäusen mit Immundefekten deutlich am schlechtesten in der Lage, invasives Pilzwachstum effektiv zu bekämpfen<sup>8</sup>. Ihren Namen haben neutrophile Granulozyten durch die bereits im Lichtmikroskop auffällig dichte Masse an

cytosolischen Granula, die im Gegensatz zu basophilen oder eosinophilen Granulozyten sich in der H.E.-Färbung neutral verhalten<sup>139</sup>. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Mechanismen, mit denen neutrophile Granulozyten mikrobielle Organismen (im Wesentlichen Bakterien und Pilze) abtöten, vielfältig sind und sich teilweise gegenseitig verstärken<sup>1,139</sup>.

Seit Langem wird in der Pilzforschung der Funktion der NADPH-Oxidase im Rahmen des sogenannten *oxidative burst*, der Produktion diverser radikaler Sauerstoffspezies (ROS), eine Hauptrolle im Rahmen des intravakuolären Abtötens von Mikroorganismen zugesprochen<sup>139,140</sup>. Diese Annahme kommt, neben dem offensichtlich antimikrobiellen Potenzial von ROS, unter anderem daher, dass Patienten der genetischen Erkrankung septische Granulomatose, bei denen die Funktion eben dieser NADPH-Oxidase defekt ist, eine deutlich erhöhte Inzidenz von Infektionskrankheiten vor allem durch *Staphylokokken*, aber auch durch *Candida albicans* und andere invasive Pilzkrankungen, aufweisen<sup>7,139,141</sup>. Im Mausmodell eines NADPH-Defekts konnte außerdem eine erhöhte Last invasiver Hyphen von *A. fumigatus* nachgewiesen werden<sup>142</sup>. Neben einer direkten oxidativen Abwehrfunktion ausgelöst durch die ROS-Produktion der NADPH-Oxidase wird der NADPH-Oxidase zudem eine entscheidende indirekte Funktion zugesprochen<sup>139,143</sup>: Durch die Produktion von ROS wird ein Ionengradient geschaffen, der die Degranulation von Vesikeln gefüllt mit diversen antimikrobiellen Proteinen wie Cathepsin-G, Proteinase 3, Lysozym oder Defensin auslöst, welche klassischerweise als nicht-oxidative Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten beschrieben werden<sup>1,139,143–145</sup>. Interessanterweise wird bei Ausschaltung für die ROS-Abwehr wichtiger Proteine wie der Superoxid-Dismutase in *A. fumigatus* nur teilweise eine reduzierte Virulenz beobachtet<sup>146,147</sup>. Die genaue Rolle von ROS bleibt also noch unvollständig verstanden.

Ein weiterer wichtiger Abwehrmechanismus neutrophiler Granulozyten stellen die Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) dar<sup>7,148</sup>. Wie der Name verrät, sind diese Teil des bisher noch weniger erforschten extrazellulären Arsenalts neutrophiler Granulozyten. NETs bestehen aus einem Rückgrat aus Chromatin (weshalb sie durch DNAsen verdaut werden, aber resistent gegenüber Proteasen sind) und enthalten weiterhin Bestandteile neutrophiler Granula wie Lactoferrin, Calprotectin, Elastase,

Cathepsin G, MPO u.a.<sup>7,148</sup>. Die Bildung von NETs wird durch eine Vielzahl an Stimuli induziert. Im Allgemeinen können dies all jene Stimuli sein, die neutrophile Granulozyten aktivieren, wie beispielsweise durch IL-8, bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) sowie durch die schlichte Anwesenheit von Bakterien oder Pilzen<sup>7,149</sup>. Nach ihrer Aktivierung beginnt ein bestimmter Anteil neutrophiler Granulozyten ein „Selbstmordprogramm“ einzuleiten, welches auch die Bildung von NETs zur Folge hat<sup>7,149</sup>. Auch die Bildung von NETs erfordert dabei einen *respiratory burst*<sup>7,69,149</sup>, ein weiterer Beleg also dafür, dass die Bildung von ROS – gleichermaßen als Beginn einer Kettenreaktion - als Auslöser vieler Mechanismen in neutrophilen Granulozyten zu sehen ist.

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei der invasiven Aspergillose erfolgt maßgeblich über die Aktivierung des IL-1 $\alpha$ /MyD88/IL-1-R Signalwegs durch die Freisetzung von IL-1 und anderen von AM und Epithelzellen sezernierten Zytokinen, sowie später über die Aktivierung des CARD-9 Signalwegs durch Zytokine, die von neutrophilen Granulozyten selbst freigesetzt werden<sup>7,142,150,151</sup>. Neutrophile Granulozyten erkennen *A. fumigatus* vor allem über Dectin-1 - einen Rezeptor, welcher an  $\beta$ -Glucane der Zellwand bindet<sup>1,67,70</sup> - sowie über den Rezeptor CR3<sup>152</sup>. Sie sind in der Lage, sowohl Konidien als auch Hyphen abzutöten<sup>1,69</sup>. Interessanterweise wird Ihnen dabei vor allem bei der Bekämpfung von Hyphen eine übergeordnete Rolle zugesprochen<sup>15</sup>. Es scheinen dabei jeweils unterschiedliche, teilweise überlappende Mechanismen zum Einsatz zu kommen, je nachdem ob Konidien oder Hyphen attackiert werden<sup>69</sup>. Konidien werden durch Phagozytose und klassischen intravakuolärem Verdau bekämpft, wobei eine Degranulation von Vesikeln sowie ein *respiratory burst* beobachtet werden<sup>145,151,153</sup>. Weiterhin beobachtet wird eine Freisetzung von Lactoferrin mit konsekutiver Wachstumsinhibition der Konidien durch Eisendepletion<sup>154,155</sup>. Interessant ist die im Vergleich zu Makrophagen *in vitro* deutlich höhere Effizienz der Granulozyten beim Abtöten von Hyphen und Konidien<sup>15,156</sup>. Sowohl für das Abtöten von Konidien als auch für das Abtöten von Hyphen scheint eine ROS-Produktion über den Syk/PI3K/PKC $\alpha,\beta$ -Signalweg wichtig zu sein<sup>69,151,157</sup>. Von neutrophilen Granulozyten freigesetztes Calprotectin scheint Hyphen im Wachstum erfolgreich zu inhibieren, hat jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf das intravakuoläre

Abtöten von Konidien<sup>158</sup>. Sowohl Komplementsystem als auch Antikörper sind in der Lage, an Hyphenoberflächen zu binden, diese Opsonierung ist für die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten jedoch nicht zwingend notwendig<sup>15,159</sup>. Der genaue Prozess der Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Hyphenoberflächen ist – genauso wie die weiteren Mechanismen des Abtötens der Hyphen – jedoch noch unzureichend erforscht<sup>1</sup>. Die Anwesenheit von Hyphen erwirkt weniger als die von Konidien<sup>160</sup> außerdem die ROS-abhängige Bildung von NETs und führt – etwa durch die Wirkung der enthaltenen Chelatoren wie Calprotectin – zu einer Wachstumsinhibition des Pilzes<sup>161</sup>. Es gibt jedoch Hinweise für eine eher redundante Funktion von NETs: Neutrophile Granulozyten, denen die Fähigkeit NETs zu bilden entzogen wurde, sind dennoch in der Lage, *A. fumigatus* erfolgreich abzutöten<sup>7</sup>, zudem scheint die Bildung von NETs im Keratitis-Modell einer Infektion durch *A. fumigatus* nicht essentiell zu sein<sup>152</sup>.

## **5.10 Die Bestimmung der fungalen Überlebensrate: Eine methodische Herausforderung**

Ein entscheidender Parameter, wenn es um Resistenz- bzw. Virulenzfaktoren in der Mikrobiologie geht, stellt *in vitro* die Überlebensrate (engl. *killing ratio*) dar. Diese wird in einem sogenannten *killing assay* bestimmt und ist definiert als die Fraktion des untersuchten Organismus, die erfolgreich von gewissen Stressoren (etwa Immunzellen oder chemische Reagenzien) abgetötet wird.

Die bakteriologische Forschung greift oftmals auf ein einfaches Verfahren zurück, das zeit- und kosteneffizient eine Überlebensrate bestimmt: Bei der sogenannten *CFU* (*colony forming unit*)-Messung werden Bakterien durch antimikrobielle Substanzen oder auch Immunzellen gestresst<sup>162,163</sup>. Anschließend werden überlebende Bakterien auf Agarplatten ausplattiert<sup>162,163</sup>. Bei passender Verdünnung kann nun, wenn Bakterien einzeln auf der Platte zum Liegen kommen, eine optische Auszählung der *CFUs* erfolgen und Unterschiede quantifiziert werden. Auch wenn dieser Ansatz auch für *A. fumigatus* versucht wurde<sup>69</sup>, scheint dies aus mehreren Gründen zumindest für Hyphen nicht sinnvoll: Erstens ist ein mechanisches Lösen der sehr schnell an Oberflächen (wie dem Boden von Probengefäßen) haftenden Hyphen durch ihre im Vergleich zu Bakterien viel größere und dreidimensionale Struktur nicht ohne

erhebliche Beschädigung des Pilzes möglich und führt damit vermutlich zu einer starken Verfälschung der wahren *killing ratio*. Zweitens ergibt sich im Falle einer reinen Schüttelkultur, bei der man eine Haftung am Boden vermeiden würde, das Problem der starken Haftung mehrerer Sporen oder Hyphen aneinander. Dies macht nach Ausplattierung die Antwort auf die Frage, ob eine zählbare Pilzkolonie wirklich nur von einer einzelnen Hyphe ausging, unmöglich<sup>164</sup>. Die *CFU-Messung* kommt somit für *A. fumigatus* allenfalls für ruhende – also noch nicht aneinander und am Boden haftende - Sporen in Frage.

Am häufigsten in der Literatur vertreten sind metabolische assays<sup>69,155,160,165</sup>, die üblicherweise anhand der Erfassung von Farbumschlägen eines Stoffwechselindikators quantitativ zelluläre Aktivität nachweisen können. Als Indikatorsubstanzen etabliert haben sich im Wesentlichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) sowie Resazurin<sup>69,155,160,165</sup>. Bei metabolischen assays werden nach einer variablen Vorinkubation des zu untersuchenden mikrobiologischen Organismus und einer Einwirkzeit des jeweiligen Stressors wieder Normalbedingungen hergestellt (im Falle von Immunzellen erfolgt dies mittels Lyse bspw. mit Eiswasser<sup>69,155</sup>, im Falle solubler Reagenzien mittels eines Mediumwechsels<sup>166</sup>), anschließend wird die Stoffwechselaktivität gemessen. Jetzt sollte sich im Vergleich zu einer Kontrollprobe, in der keine Stressoren hinzugegeben wurden, eine deutliche Reduktion der verbliebenen Stoffwechselaktivität zeigen. Vorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, durch die maschinelle Auswertung eine große Anzahl an Proben (üblich sind beispielsweise 96-well Platten<sup>69,155</sup>) gleichzeitig zu testen. Insbesondere in Bezug auf *A. fumigatus* gibt es jedoch auch Nachteile dieses Ansatzes: Der schwerwiegendste Nachteil ist die Unmöglichkeit, Tötung von einer starken Wachstumsinhibierung zu unterscheiden, da lediglich Stoffwechselaktivität gemessen wird. Zudem muss sehr kritisch mittels passender Kontrollexperimente hinterfragt werden, inwieweit einzelne Stämme bzw. genetisch veränderte Mutanten den Prozess einer ggf. nötigen Lyse von Immunzellen problemlos überstehen, oder diese womöglich (mehr als der mitgeführte Wildtypstamm) durch den Lyseprozess inhibiert, beschädigt oder auf andere Weise beeinträchtigt werden, was ihre Stoffwechselaktivität und damit das metabolische Assay verfälschen könnte. Weiterhin

ist generell in Frage zu stellen, inwieweit sich stark wachstumsinhibierte Mutanten für eine solche Testung eignen, da sich a) die nötige Inkubationszeit bis zur messbaren Stoffwechselaktivität im Assay stark verlängert - wobei allen möglichen Störfaktoren größerer Einfluss zukommt - und b) notwendige „Eich“-experimente mit anderen, nicht wachstumsinhibierten Stämmen erheblich erschwert werden.

Auf der anderen Seite stehen Ansätze, die eine mikroskopische Auswertung beinhalten<sup>167–169</sup>. Dabei kommt dem positiven bzw. negativem Vitalitätsnachweis überlebender bzw. abgetöteter Hyphen eine entscheidende Bedeutung zu. Die Idee ist hierbei, nach Einwirkung des entsprechenden Stressors und einer meist nötigen Fixation und Einbettung des Experiments in geeignete Trägerlösungen die Überlebensrate durch mikroskopische Auszählung der vitalen respektive der getöteten Hyphen zu bestimmen. Dies setzt voraus, dass eine Unterscheidung zwischen vitalen und abgetöteten Hyphen zuverlässig möglich ist. Hierzu greifen manche Arbeitsgruppen auf Vitalitätsfärbungen zurück, die bei erhaltener Vitalität oder beim Absterben ein durch ein geeignetes Mikroskop erkennbares Fluoreszenzsignal erzeugen<sup>167,168</sup>. Größter Vorteil dieses Ansatzes ist die direkte Berechnung der Überlebensrate durch Vitalitätsbestimmung<sup>167–169</sup>, was den schwerwiegendsten Nachteil des metabolischen Ansatzes – nämlich die lediglich indirekte Bestimmung über die Stoffwechselaktivität – aufzuheben vermag.

Ein weiterer Ansatz der mikroskopischen Auswertung fungalen Überlebens stellt die Methode „FLARE“ (Fluorescent *Aspergillus* Reporter) dar<sup>7,157,170,171</sup>. Diese Methode basiert auf cytosolische Fluoreszenz in *A. fumigatus* Sporen: Im Phagolysosom von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten kann das Erlöschen des Fluoreszenzsignals als Äquivalent für eine stattgehabte Abtötung der Spore gesehen werden<sup>170,172</sup>. Diese Methode schafft Unabhängigkeit von chemischen Reagenzien zur Vitalitätsbestimmung. Unklar ist jedoch, inwieweit das System auf dreidimensionale, weitaus größere Organismen wie *A. fumigatus* in Hyphenform übertragen werden kann<sup>170</sup>.

### **5.11 Zielsetzung**

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Bestimmung der Überlebensrate von Mutanten des Zellwandintegritätswegs gegenüber Stress, ausgelöst durch humane neutrophile Granulozyten. Zu diesem Zweck erfolgte die Entwicklung und Etablierung eines neuen Ansatzes zur Vitalitätsbestimmung von Hyphen im Setting eines *killing assay*. Die Funktionsweise der Methode sowie die Kriterien zur Lebend-/Totdifferenzierung werden anhand mehrerer, der Validation dienender Experimente erläutert, alternative Ansätze werden aufgezeigt und diskutiert. Eine durch die neue Methode entdeckte Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten und einem Zellwandstresser eines Stammes, der eine Mutation der Rho-GTPase Rho2 aufweist wird in folgenden Abschnitten der Dissertation näher mittels genetischen und mikrobiologischen Methoden untersucht um Erkenntnisse über den möglichen Hintergrund dieser Eigenschaften zu erlangen.



## 6 Material und Methoden

### 6.1 Vorbemerkung

Ich weise darauf hin, dass die Beschreibung von Methoden, die von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe regelmäßig seit mehreren Jahren im Wesentlichen unverändert durchgeführt wurden, teilweise aus Arbeiten von Vordoktoranden dieser Arbeitsgruppe übernommen wurden. Auf eine Zitierung wurde dabei bewusst verzichtet, da hier aufgeführte Methoden und Arbeitsweisen keinerlei Innovation oder wissenschaftliche Neuerungen bedeuten, sondern lediglich eine rein deskriptive Auflistung einzelner Arbeitsschritte oder Experimente darstellen.

### 6.2 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien, die zur Anfertigung dieser Arbeit dienten, wurden von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich (Steinheim), Serva (Heidelberg).

Wenn möglich wurde stets der höchste Reinheitsgrad „pro analysis“ (p.a.) bezogen.

Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Madison, USA), Quiagen (Hilden), Sigma Aldrich (Steinheim). LPS wurde von der Firma Invivogen (San Diego) bezogen, es handelt sich um das Produkt *LPS-EK Ultrapure* von *E. coli* Stamm K12.

### 6.3 Geräte

CO2-Inkubator	UniTec, Revo Ultima
Digitalkamera	Canon,EOS 550D
Gelkammer	BioRad, Power Pac 1000
Magnetrührer	Heidolph, MR3001K
Mikrobiologischer Brutschrank	Haraeus, Function Line
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DM LB, SP5
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 25

PCR Gerät	Biometra, T Gradient
pH-Meßgerät	Toledo 320
Photometer	Amersham Biosciences, Ultrospec 10
Probenkammern	Ibidi 8-well
Schüttelinkubator	Brunswick Scientific, Series 25
Sterilbank	Heraeus, Hera Safe
Thermomixer	Eppendorf
Vortexer	Scientific Instruments
Zentrifuge	Sigma Laboratory, 6K15
Zentrifuge	Eppendorf, 5417R

## 6.4 Zellanzucht

### 6.4.1 *Aspergillus fumigatus*

#### 6.4.1.1 Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Medien stets durch Autoklavieren über 20min bei 121 °C und 3 bar sterilisiert. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien in ihrer Zusammensetzung inklusive Anleitung zur Herstellung aufgeführt.

#### *Aspergillus*-Minimal-Flüssigmedium(AMM) (2-fach konzentriert):

Salzmischung ohne MgSO <sub>4</sub> (20-fach konzentriert)	50ml
MgSO <sub>4</sub> -Lösung (0,4M, 200-fach konzentriert)	5ml
Glukose 40% (w/v)	25ml
Spurenelement-Stammlösung (1000-fach konzentriert)	1ml
dest. H <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 1000ml

Der pH-Wert von AMM liegt bei ca. 6,6. Das Medium konnte nach dem Autoklavieren der Einzelbestandteile bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Die einzelnen Bestandteile von AMM sind folgendermaßen zusammengesetzt:

Salzmischung ohne  $\text{MgSO}_4$  (20-fach konzentriert):

$\text{NaNO}_3$	120g
KCl	10,4g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	16,3g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	20,9g
dest. $\text{H}_2\text{O}$	Auffüllen auf 1000ml

Nach dem Lösen wurde die Flüssigkeit autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

$\text{MgSO}_4$ -Lösung (200-fach konzentriert):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,4g
dest. $\text{H}_2\text{O}$	100ml

Nach dem Lösen wurde die Flüssigkeit autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

40% Glucose (w/v):

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	200g
dd $\text{H}_2\text{O}$	auffüllen auf 500mL

Die komplette Menge Glucose löst sich meist erst beim Autoklavieren. Anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Spurenelement-Stammlösung (1000-fach konzentriert):

Für die Herstellung der Spurenelement-Stammlösung wurde wie zuvor publiziert vorgegangen<sup>173</sup>. Die unten aufgeführten Substanzen wurden in der angegeben

Reihenfolge in 100ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und diese Lösung anschließend autoklaviert. Anschließend wurde jeweils 1ml der Lösung in ein steriles Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt. Der pH-Wert dieser Lösung betrug ca. 6,5.

ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	2,2g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,1g
MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	0,5g
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	0,5g
CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,16g
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	0,16g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	0,11g
Na <sub>4</sub> EDTA • 4 H <sub>2</sub> O	6,0g
dest. H <sub>2</sub> O	100ml

AMM-Agar(-Platten):

Für die Herstellung von AMM-Agar-Platten wurde eine sterile und erwärmte, 2-fach konzentrierte AMM-Stammlösung ohne Glukose im 1:1 Verhältnis mit sterilem und flüssigem Agar (2% (w/v) Glucose, 4% (w/v) Bacto-Agar) in Zentrifugengefäßen (50ml) vermischt und anschließend in Platten gegossen. Nach Erstarrung wurden die Platten meist sofort verwendet, eine Lagerung bei 4 °C für einige Tage war jedoch möglich. Zusatzstoffe wie Selektionsmarker oder Stressor-Substanzen wurden in die 2-fach konzentrierte AMM-Lösung ohne Glukose zugegeben, bevor der Agar hinzugefügt wurde.

Sabouraud-Medium:

2% Pepton-Lösung (w/v) pH 7.0	50mL
40% Glucose (w/v)	10mL
ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 100mL

Für Sabouraud-Medium wurden die oben genannten Lösungen steril zusammengefügt und die Lösung anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2% Pepton-Lösung (w/v):

Pepton	10g
ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 500mL

Die oben angegebene Menge Pepton wurde eingewogen und anschließend auf ca. 400mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,0 mit KOH eingestellt und die Lösung auf 500mL aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde die Pepton-Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Sabaraud-Agar(-Platten):

Für Sabouraud Agar Platten wurde 2% Pepton (w/v) mit erwärmtem 2xSabaraud Agar (8% (w/v) Glucose, 4% (w/v) Bacto-Agar) im 1:1 Verhältnis gemischt.

**6.4.1.2 Anzucht und Ernte von Sporen**

Pilzsporen wurden bei 4°C gelöst in sterilem ddH<sub>2</sub>O im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Anzucht neuer Sporen wurden sterile Zellkulturflaschen verwendet (75 cm<sup>2</sup>). Diese wurden mit 50mL AMM-Agar gefüllt, anschließend wurden sterile Glasperlen mit einem Durchmesser von 4mm zur Verteilung der Sporen hinzugegeben. Bei Bedarf wurde dem AMM-Agar für die Selektion von Sporen mit z.B. GFP-Plasmiden oder Doxycyclin für konditionelle Promotoren ein Zusatzstoff hinzugefügt.

Zur Anzucht neuer Sporen konnten Sporen aus bereits vorhandenen Sporensuspensionen („Sporenstock“) in einem Volumen von ca. 30µl in die Zellkulturflasche überführt und anschließend durch Schütteln auf dem Agar verteilt werden. Alternativ konnten Sporen von Ausstrichplatten mit Hilfe einer sterilen Impföse in sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst werden, woraufhin anschließend die entstandene Sporensuspension anschließend in die Zellkulturflasche gegeben wurde.

Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für 2-3 Tage bei 37°C inkubiert, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Pilzstamms.

Für die Sporenernte des entstandenen Pilzmycels wurden ca. 10ml steriles ddH<sub>2</sub>O in die Zellkulturflasche gegeben. Durch leichtes Schütteln der Flasche mit den Glasperlen lösten sich die Sporen zusammen mit Teilen des Mycels und Agars. Deshalb wurde

die Lösung anschließend mithilfe eines sterilen Miracloth-Filter in ein 50ml Falcon-Probengefäß filtriert. Die verwendeten Filter bestanden aus einem Trichter, der mit Miracloth-Papier ausgelegt war und vor der Benutzung autoklaviert wurde.

Die so gewonnene Sporenlösung („Sporenstock“) wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei dieser Lagerung waren Sporen über einen sehr langen Zeitraum haltbar, allerdings wurden sie aufgrund der mit der Zeit abnehmenden Auskeimungsgeschwindigkeit und -rate nur für ca. 2-3 Wochen für Experimente genutzt.

#### **6.4.1.3 Anzucht und Ernte von Pilzmyzel**

Für die Anzucht von Pilzmyzel wurden Sporen aus einer Sporensuspension in ein Flüssigmedium gegeben und anschließend aerob bei 37°C und 180rpm inkubiert. Nach der gewünschten Zeit wurde das Myzel abgeerntet, abhängig von der weiteren Nutzung des Myzels (z.B. Transformation, Extraktion chromosomaler DNA). Hierfür wurde das gesamte Flüssigmedium mit dem darin befindlichen Mycel über Miracloth-Filter filtriert und das Mycel vom Filterpapier in neue Probengefäße überführt.

#### **6.4.1.4 Bestimmung der Sporenzahl**

Die Sporenzahl einer Suspension wurde mit Hilfe ihrer optischen Dichte bei 600nm ( $OD_{600}$ ) ermittelt. Das Messgerät wurde mit ddH<sub>2</sub>O geeicht und anschließend je nach Trübung der Sporenlösung eine 1:10 oder 1:20 Verdünnung erstellt und die OD dieser Verdünnung gemessen. Der gemessene OD-Wert sollte sich zwischen 0,2 und 0,4 befinden, da nur hier ein linearer Messbereich anzunehmen ist<sup>1</sup>. Die Sporenzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konidienzahl pro ml} = \text{gemessene } OD_{600} \times \text{Verdünnung} \times 2,24 \times 10^7$$

---

<sup>1</sup> Diese Erkenntnis stammt aus arbeitsgruppeninternen Vorversuchen, in denen die hier angewandte OD-Messungsmethode mit der klassischen Zytometer-Methode korreliert wurde

#### **6.4.1.5 Erstellung einer Verdünnungsreihe**

Um in einem Experiment eine genau definierte Anzahl von Sporen einsetzen zu können, wurden Verdünnungsreihen der Sporensuspensionen von  $5 \times 10^7$  Sporen/ml bis  $5 \times 10^3$  Sporen/ml hergestellt.

Eine  $5 \times 10^7$  Sporen/ml Verdünnung wurde aus dem Sporenstock generiert, indem berechnet wurde, wieviel der Sporensuspension des Sporenstocks mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt werden muss um auf 1mL eine Lösung mit  $5 \times 10^7$  Sporen/ml zu erhalten.

$$x \mu\text{L des Sporenstocks} = \frac{1000 \mu\text{L} \times 5 \times 10^7}{\text{Konzentration der Stammlösung} (n \times 5 \times 10^7)}$$

Die Verdünnung wurde überprüft indem erneut die OD<sub>600</sub> bestimmt wurde. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung des  $5 \times 10^7$  hergestellt. Die OD dieser Verdünnung sollte 0,21 betragen<sup>1</sup>. Falls dies nicht der Fall war, wurde die  $5 \times 10^7$  nochmals verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O bzw. die Sporenzahl durch Zugabe aus dem Sporenstock erhöht. Dies wurde wiederholt bis eine OD<sub>600</sub> von 0,21 erreicht war.

#### **6.4.2 Escherichia Coli**

##### **6.4.2.1 Medien**

###### Lysogeny Broth (LB)-Medium

1% Trypton (w/v), 0,5% Hefeextrakt (w/v) und 1% NaCl (w/v) wurden in 1L destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Für LB-Agar wurde der Lösung 2% Bacto-Agar (w/v) vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Für die Selektionierung von transformierten *E. coli* wurde dem LB-Agar vor dem gießen Ampicillin (Stock 100mg ml<sup>-1</sup>) in einer Endkonzentration von 100 µg ml<sup>-1</sup> hinzugefügt.

###### SOB(Super Optimal Broth)-Medium

20g Tryptone, 5g Hefeextrakt und 0,5g NaCl wurden in 950mL destilliertem Wasser gelöst und dann 10mL 250mM KCl hinzugefügt. Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt, die Lösung auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Vor der Benutzung wurden 5ml steriles 2M MgCl<sub>2</sub> pro Liter hinzugefügt.

#### **6.4.2.2 Anzucht und Ernte**

Für die Anzucht von *E. coli* wurde die gewünschte Menge LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und je nachdem mit Ampicillin Endkonzentration 100µg ml<sup>-1</sup> versetzt. Anschließend wurden die Bakterien mittels einer sterilen Pipettenspitze oder einer abgeflamten Impföse hinzugefügt. Danach wurde der Erlenmeyerkolben bei 37°C und 180rpm über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien je nach Weiterverarbeitung geerntet.

### **6.5 Molekularbiologische Methoden**

#### **6.5.1 Isolierung genomischer DNA**

Die Isolation genomischer DNA aus *Aspergillus fumigatus* erfolgte mit Hilfe des MasterPure™ Yeast DNA Purification Kits (Epicentre Biotechnologies, Madison USA).

Hierzu wurde entweder wie in 6.4.1.3 beschrieben *A. fumigatus* in Flüssigmedium angezogen oder direkt von der Platte genommen mit Hilfe einer sterilen Pinzette.

Das Mycel wurde in ein steriles Sammelgefäß (2ml) mit Schraubverschluss gegeben, welches bereits mit 250µL  $\neg$ Lyse-Lösung, einer Holzkugel und Quarzsand vorgeladen war. Anschließend wurde das Sammelgefäß mittels Vortexgerät geschüttelt für 40s bei 6000rpm und dann 30min inkubiert bei 65°C.

Danach wurde 125µL Protein-Präzipitationslösung hinzugefügt und die Röhrchen 10min bei 10 000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein 1,5mL Eppendorfgefäß überführt und die DNA mittels 500µL 99% Isopropanol gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 4°C und 15 000 rpm 15min abzentrifugiert, anschließend der Überstand abgenommen (ohne das DNA-Pellet zu zerstören) und 500µL 70% Ethanol hinzugefügt. Danach wurde erneut 15min bei 4°C und 15 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei 55°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 100µL ddH<sub>2</sub>O gelöst und zur Aufbewahrung eingefroren.

#### **6.5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines NanoDrop bestimmt. Dazu wurde die DNA gegen eine Leerprobe mit ddH<sub>2</sub>O gemessen. Um die Reinheit der DNA festzustellen wurde das Verhältnis der ermittelten OD bei 260nm und 280nm



betrachtet. Ein Verhältnis von 260nm zu 280nm von 1,8 bis 2,0 zeigte eine proteinfreie DNA-Probe.

### 6.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) benutzt. Die Primer, kurze Oligonukleotide die am Start und komplementär am Ende des zu amplifizierenden Bereichs binden, wurden bei der Firma Metabion (München) bestellt.

Als Template wurde genomische DNA von *Aspergillus fumigatus* oder *E. coli* genutzt. Benutzte Polymerasen waren die *Taq*-Polymerase oder die *Pfu*-Polymerase. Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität und damit eine proof reading-Funktion, wodurch eine geringere Fehlerrate erreicht wird. Aus diesem Grund wurde die *Pfu*-Polymerase für Klonierungen benutzt, die *Taq*-Polymerase für Kontroll-PCRs oder nicht kodierende Genbereiche.

#### PCR-Zusammensetzung *Taq*-Polymerase

10xDream Taq Buffer	5µL
genomische DNA (Template)	1µL
dNTPs	1µL
Primer vorwärts	0,5µL
Primer rückwärts	0,5µL
ddH <sub>2</sub> O	41,75µL
Taq-Polymerase	0,25µL
Komplett	50µL

#### PCR-Zusammensetzung *Pfu*-Polymerase

10xPfu Buffer	5µL
genomische DNA (Template)	1µL
dNTPs	1µL
Primer vorwärts	0,5µL
Primer rückwärts	0,5µL
ddH <sub>2</sub> O	41,3µL
Pfu-Polymerase	0,7µL
Komplett	50µL

#### PCR-Programm

(1) Initiale Denaturierung	95°C	2min
(2) Denaturierung	95°C	30s
(3) Anlagerung der Primer	Temperatur abhängig vom Primern	30s
(4) Verlängerung	72°C	je nach Länge des PCR-Fragments
(5) Finale Verlängerung	72°C	ca. das Doppelte der Verlängerungszeit
(6) Abkühlung	4°C	

Die Temperatur für die Anlagerung der Primer lag ca. 2-3 Grad unter der errechneten Schmelztemperatur. Die Verlängerungszeit orientierte sich an der Länge des gewünschten PCR-Fragments. Die Amplifikationsrate beträgt ca. 1000bp/min für *Taq*, ca. 500bp/min für *Pfu*.

#### **6.5.4 PCR-Aufreinigung**

Zur Aufreinigung von PCR Ansätzen wurden das Wizard<sup>TM</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) und das PrepEase<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit (Affymetrix, USB Corporation, Cleveland, USA) genutzt. Beide wurden nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die Aufreinigung wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### **6.5.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente wurden zunächst 1% Agarose (w/v) in TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gelöst, aufgeköcht und in ein Gel mit Taschen gegossen. In diese Taschen wurde die DNA zusammen mit Ladepuffer geladen und dann in einer Kammer gefüllt mit 1xTAE-Puffer und eine Spannung angelegt zwischen 100 und 120V. Mit den Proben zusammen wurde ein 1kB-Größenstandard als Referenz geladen.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad für ca. 20min gefärbt, anschließend kurz in 1xTAE Puffer gewaschen und dann mittels eines Geldokumentationsgeräts ausgewertet. Ethidiumbromid interkaliert in DNA und erhöht so die Emissionsfähigkeit der DNA. Mittels UV-Licht (240nm) wird die DNA angeregt und die DNA-Banden sichtbar gemacht.

#### 50xfach konzentrierter TAE-Puffer

Für den Puffer wurden 242g TRIS (2M) eingewogen, 100ml 0,5M EDTA-Lösung (pH=8.0) und 57,1 mL Essigsäure (100%) hinzugefügt. Anschließend wurde alles auf 1L mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

#### 6xfach konzentrierter Ladepuffer für DNA-Elektrophorese

Der Ladepuffer wurde hergestellt aus 30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau und 1xTAE-Puffer.

### 6.5.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die mittels Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden im Agarosegel konnten auch, falls gewünscht, aus dem Gel ausgeschnitten werden und anschließend mit dem Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) oder dem PrepEase™ Gel Extraction Kit (Affymetrix, USB Corporation, Cleveland, USA) extrahiert werden. Beide wurden nach der Anleitung des Herstellers eingesetzt.

### 6.5.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. Coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden *E. coli* aus dem -80°C Stock auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 mL SOB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500 mL SOB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur und 180 rpm inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht hatte (ca. 4h). Dann wurde die Kultur in 50 ml Falcon-Probengefäße überführt und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien bei 2500 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet in 10 mL TB-Puffer resuspendiert und wieder 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert für 15min bei 2500 x g und 4°C. Während der Zentrifugation wurden 18,6 mL kalter TB-Puffer mit 1,4 mL DMSO (7%) gemischt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 5 mL des kalten TB-DMSO Puffers resuspendiert. Die Suspension wurde erneut 10min auf Eis inkubiert und dann in 200 µL Aliquots in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die aliquotierten kompetenten Zellen wurden -80°C aufbewahrt.

#### 1L TB-Puffer

TB Puffer wurde jedes Mal frisch zubereitet, wenn erneut kompetente Zellen hergestellt wurden.

10 mM Pipes Na-Salz	3,35g
15mM CaCl <sub>2</sub>	2,2g

250mM KCl	18,64g
55mM MnCl <sub>2</sub>	10,9g

PIPES, CaCl<sub>2</sub> und KCl wurden in ca. 800 mL destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH auf 6,7 eingestellt. Danach wurde das MnCl<sub>2</sub> hinzugefügt und das Volumen auf 1 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer steril filtriert und im Kühlschrank kühl gestellt.

### **6.5.8 Transformation in *E. Coli***

Chemisch kompetente DH5α *E. coli* Bakterien wurden dazu benutzt Plasmide zu vervielfältigen. Dazu wurden *E. coli* auf Eis gelegt und dort von -80°C aufgetaut. Anschließend wurde Plasmid-DNA (1µL) oder ein Ligationsansatz (10µL) hinzugegeben. Anschließend wurden sie 30min auf Eis inkubiert und 90s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Dann wurde nach einem Abkühlschritt für 2min auf Eis 1ml LB-Medium hinzugefügt und für 1h bei 37°C und 600rpm inkubiert. Die gewachsenen *E. coli* wurden 2min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Dann wurde ca. 800µL an Überstand abgenommen und die Bakterien in den restlichen 400µL resuspendiert.

Anschließend wurden die *E. coli* im Falle eines zuvor ligierten Plasmids auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert, im Falle eines bereits vorhandenen Plasmids in 60ml LB-Medium mit Ampicillin inkubiert.

### **6.5.9 Plasmidisolation**

#### **6.5.9.1 Miniprep**

Zur Überprüfung von Plasmidklonierungen wurde aus den Transformanten DNA isoliert. Für die Isolation von geringen Plasmid DNA Mengen (ca. 1-7µg) wurde das PureYield™ MiniPrep Kit von Promega genutzt.

Jeder gewachsene Klon der Transformations-Agarplatte wurden zum einen auf einer LB-Agarplatte mit 100µg/ml Ampicillin ausgestrichen und zum anderen 3 ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin angeimpft. Die LB-Ampicillin-Agarplatte wurde bei 37°C und das LB-Medium bei 37°C und 180rpm über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die LB-Ampicillin-Agarplatte aus dem Inkubator genommen und zum Stoppen weiteren Wachstums weiter im Kühlschrank aufbewahrt. Aus den in 10mL Falcons angezogenen Bakterienkulturen wurde mittels des PureYield™ Plasmid Miniprep Kits das Plasmid nach Einleitung des Herstellers isoliert.

#### **6.5.9.2 Midiprep**

Um größere Mengen bereits bestätigter, korrekt klonierter Plasmide zu erhalten, wurde das Plasmid erneut in kompetente *E. coli* transformiert (siehe 6.5.8) und anschließend 60ml LBamp-Flüssigmedium mit den resuspendierten *E. coli* angeimpft. Am nächsten Morgen wurde das Plasmid mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep Kit nach Anleitung des Herstellers isoliert.

#### **6.5.10 Durchführung einer Colony-PCR**

Ein ungenaueres, aber schnelleres Verfahren zur Überprüfung von Plasmidklonierungen aus transformierten *E. coli* ist die Methode der Colony-PCR. Hierbei wurde mittels einer Impföse Teile der gewachsenen Kolonien (daher der Name) der Transformations-Agarplatte direkt in vorbereitete Eppis als DNA-template für die Durchführung einer Bestätigungs-PCR des jeweiligen Konstrukts gegeben.

Diese PCRs liefern erfahrungsgemäß als Nachteil viele unspezifische Nebenprodukte in Form von falschen Banden, kann aber als Orientierung direkt am nächsten Tag nach einer Transformation in *E. coli* hilfreich sein. Die Zeitersparnis ist dabei ein voller Tag, da keine Miniprep (siehe dort) durchgeführt werden muss, welche eine Inkubationsschritt über Nacht beinhaltet. Liefert eine Colony-PCR eindeutige Ergebnisse, kann direkt zur Midiprep (siehe dort) übergegangen werden.

### **6.6 Herstellung von genetisch veränderten Pilzstämmen**

Es wurde bereits publiziert<sup>174</sup>, wie gezielte genetische Mutation mittels Transformation in *A. fumigatus* durch die Ausschaltung der nicht-homologen End-zu-End-Verbindung (engl. non-homologue end-joining) erheblich erleichtert werden kann. Von dieser Arbeitsgruppe wurde der Stamm AfS35 als Wildtyp-analog verwendet, welcher ursprünglich auf den Wildtypstamm D141 zurückgeht. AfS35 ist eine Deletionsmutante für das Gen *akuA*. *AkuA* bildet mit *akuB* ein Heterodimer, welches für das non-homologue end-joining benötigt wird. Durch den Verlust dieses Gens ist der Stamm

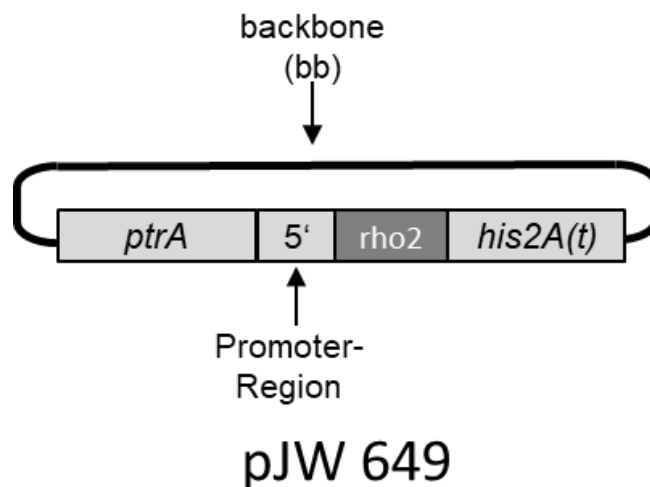
AfS35 nur noch über homologe Rekombination in der Lage, Fremd-DNA in sein Genom zu integrieren.

### 6.6.1 Herstellung von Stämmen mit mitochondrialem GFP

Für die meisten mikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit kamen auf die gleiche Weise genetisch veränderte Stämme zum Einsatz, bei denen unter Verwendung von GFP (Green fluorescent protein) die mitochondriale Morphologie und Dynamik sichtbar gemacht wurde. Hierzu wurde der Wildtypstamm AfS35 sowie die in den entsprechenden Kapiteln genannten genetischen Mutanten mit dem Plasmid pCH005 wie in 6.6.6 beschrieben transformiert. Im Plasmid pCH005 ist ein N-terminales mitochondriales Zielsignal enthalten sowie ein Abschnitt, der für die ersten 59 Aminosäuren des Proteins Citratsynthase von *Aspergillus niger* fusioniert mit dem GFP-Analog sGFP kodiert<sup>9</sup>. Als Promoter ist im Konstrukt der konstitutiv aktive *Aspergillus nidulans* Promoter *gpdA* enthalten<sup>44</sup>.

### 6.6.2 Herstellung von Stämmen mit cytosolischem GFP

Der in 7.1.3 verwendete Stamm mit cytosolischem GFP entstand durch Transformation (siehe 6.6.6) des Plasmids pJW103 in den Wildtypstamm AfS35. Das



*Abbildung 3:* Karte des Komplementationsvektors für  $\Delta\rho2$  pJW649. Der Vektor enthält neben dem Gen *rho2* einen endogenen Promoterbereich (1000bp des 5'-UTR), einen als terminierenden Bereich und zur möglichen homologen Rekombination dienenden Bereich *his2A(t)* sowie eine Resistenzkassette für Pyrimin (ptrA). Im für die Transformation in *A. fumigatus* unerheblich „Rückgrat“ (engl. backbone) des Plasmids ist unter anderem eine Ampicillin-Resistenzkassette enthalten.

Konstrukt enthält das GFP-Analogon sGFP, als Promoter kommt der konstitutiv aktive *Aspergillus nidulans* Promoter *gpdA* zum Einsatz<sup>45</sup>.

### 6.6.3 Herstellung neuer Klone der $\Delta\rho2 + \rho2$ Komplementationsmutante

Für die Herstellung neuer Klone von  $\Delta\rho2 + \rho2$  wurde der bereits vorhandene Vektor pJW649, der in vorausgegangenen Arbeiten bereits für die Komplementation von  $\Delta\rho2$  verwendet wurde<sup>12</sup> erneut in AfS35 transformiert wie in 6.6.6 beschrieben. Der Vektor enthält neben dem Gen *rho2* einen endogenen Promoterbereich (1000bp des 5'-UTR), eine als terminierenden Bereich und zur möglichen homologen Rekombination dienende Sequenz *his2A(t)* sowie eine Resistenzkassette für Pyrimethamin (*ptrA*).

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Klone sowie für die in 7.3.4 beschriebene Integrationsanalyse via PCR wurden die in Tabelle 1 verwendeten Primer verwendet.

Tabelle 1 Für die Erstellung neuer Klone von  $\Delta\rho2 + \rho2$  verwendete Primer

PCR # (siehe Abbildung)	Primer- Name	Basensequenz	G/C-Anteil und Annealing- Temperatur	Fragmentgröße
1	Rho2- 3G1034 0 5- CAST #2 seq- his2A(t)- rev	CCTGTCAATGTCCGTTCT GC  CAGATGCCCCACTAAGCTT GG	20/11-59°C  20/11-59°C	2316bp
2	His2a_f wd ptrA-3- fwd	GTCTTTCGGAGACGATGG G GTCCCGTATGTAACGGTG G	19/11 59°C 19/11- 59°C	5214bp
3	ptrA-5- rev seq- his2A(t)- rev	CGTTACCAATGGGATCCC G CAGATGCCCCACTAAGCTT GG	19/11-59°C  20/11-59°C	2042bp

4	ptrA-3- fwd	GTCCCGTATGTAACGGTG G	19/11- 59°C	6020bp
	Rho2- 3G1034	TGGCCTGAGTGGCC ATGGCTCAACAACAGAAT	21/10- 58°C	
	0-3- fwdneu	GAC		

#### 6.6.4 Herstellung der $\Delta\rho2+\rho2_{add3'}$ Komplementationsmutante

Zur Herstellung der  $\Delta\rho2+\rho2_{add3'}$  Komplementationsmutante mit ergänztem 3'-UTR-Bereich wurde ein neues Plasmid konstruiert und in *E. coli* transformiert.

Zunächst wurde dabei das als Grundstock fungierende Plasmid pSK379 (enthält die notwendige Pyrithiamin-Resistenzkassette) durch das Restriktionsenzym Sma I bei 30°C über Nacht verdaut und danach mittels Agarosegel aufgereinigt und ausgeschnitten. Die zu erwartende Bandengröße war 5,5kbp.

Ansatz Enzymverdau I von pSK379

Sma I	1,5µl
ddH <sub>2</sub> O	25,5µl
pSK379	18µl
10x Puffer	5µl

Im Anschluss folgte direkt ein weiterer Enzymverdau des verdauten Plasmids durch Not I bei 37°C über Nacht.

Ansatz Enzymverdau II von pSK379

Not I	1,5µl
verdauter Vektor pSK379	52,5µl
10x Puffer	6µl

Zur Herstellung von blunt ends beim durch Not I verdauten Vektor erfolgte ein Inkubationsschritt mittels T4 DNA Polymerase zunächst 30 Minuten bei 11°C, danach zur Inaktivierung 10 Minuten bei 75°C.

Ansatz blunt ending von verdautem pSK379

verdauter Vektor pSK379	60µl
dNTPs 10mM	0,6µl
T4 DNA Polymerase	0,6µl



Um den weiter unten folgenden Ligationsschritt zu ermöglichen, erfolgte anschließend ein Dephosphorylierungsschritt mittels dem Enzym Fast AP zunächst 10 Minuten bei 37°C, danach zur Inaktivierung 5 Minuten bei 75°C.

Ansatz Dephosphorylierung von verdaulichem pSK379

verdauter Vektor psK379	61,2µl
Fast AP	1µl

Nun wurde das entstandene Konstrukt über ein Agarosegel aufgereinigt und ausgeschnitten. Die gesuchte Fragmentgröße war dabei 4,9kbp. Der geschnittene Vektor pSK379 war nun bereit zur Ligation.

Als zweites Fragment wurde das Gen *rho2* mit an den ORF angrenzenden 1126bp großen 5'-UTR (Promotorbereich) sowie als Neuerung zu pJW649 auch mit einem 1009bp großen angrenzenden 3'UTR (im Folgenden *rho2*<sub>add3'</sub> genannt) mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurde zuvor genomische DNA aus AfS35 isoliert.

Tabelle 2 Verwendete Primer bei der Amplifikation des PCR-Fragments (insert)

Primer-Name	Basensequenz	Schnittstelle	G/C-Anteil und Annealing-Temperatur	Fragmentgröße
Rho2-3G10340 5-CAST#2	CCTGTCAATGTCCGTTCTGC		20/11 59°C	3126bp
Rho2-3G10340-3'UTRre2	TTGCGGCCGCCAGCGCTGAT CCGCTACTT	Not I	29/19-73°C	

Anschließend wurde das PCR-Fragment zur Blunt-end Ligation mit dem Enzym Phosphonukleasekinase 160 Minuten bei 37°C phosphoryliert und anschließend bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert.

Ansatz Phosphorylierung des PCR-Fragments

PCR-Fragment	32µl
DNA-Ligase-Puffer	4µl
ATP 100nM	2µl
Phosphonukleasekinase	2µl

Nun erfolgte die Ligation von verdautem Vektor und PCR-Fragment (blunt-end) mit der T4-DNA Ligase bei 16°C über Nacht. Anschließend wurde das ligierte Konstrukt über ein Agarosegel aufgereinigt und ausgeschnitten.

Ansatz Ligation	
verdauter Vektor pSK379	1,7µl
PCR-Fragment	7µl
T4-DNA Ligase Puffer	0,3µl
ATP 100mM	5µl
T-DNA Ligase	1 µl

Jetzt wurde der ligierte Vektor in *E. coli* transformiert wie im entsprechenden Kapitel beschrieben. Danach wurden die auf Ampicillin-Agar angewachsenen Klone direkt mittels Colony-PCR orientierend auf Richtigkeit überprüft (siehe auch 6.5.10). Die zu erwartenden Fragmentgrößen waren 2177bp für den orthograden Einbau in das Plasmid bzw. 1071bp für den retrograden Einbau.

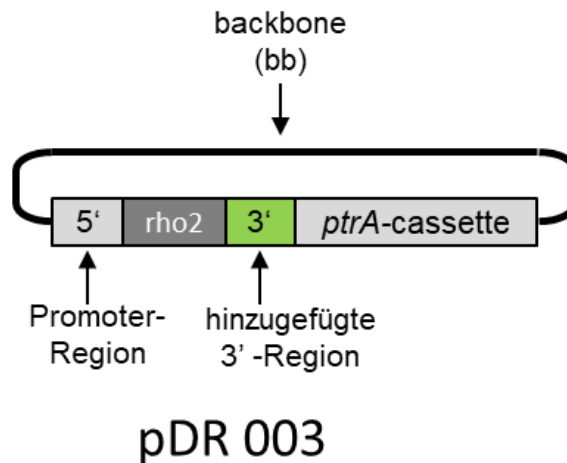
Ansatz Colony-PCR	
ddH <sub>2</sub> O	18,65µl
5x Puffer GoTaq green	5µl
Primer	0,6µl
dNTPs	0,5µl
GoTaq	0,25µl

*Tabelle 3* Verwendete Primer der Colony-PCR zur orientierenden Testung der Klone nach Transformation in *E. coli*

Primer-Name	BasenSequenz	Schnittstelle	G/C-Anteil und Annealing-Temperatur	Fragmentgröße
ptrA-5-rev	CGTTACCAATGGGATCCCG		19/11-59°C	2177bp
Rho2-3G10340-rev	TCATAGCACGATGCAACATG		21/9-55°C	
ptrA-5-rev	CGTTACCAATGGGATCCCG		19/11-59°C	1071bp
Rho2-3G10340-3-fwd	GGGCCATCTAGGCC ATCCGATAGTAATACGACCTC		22/10-58°C	

Nach Identifikation zweier richtiger Klone erfolgte die Plasmidisolation mittels Midiprep (siehe 6.5.9.2) und anschließend die Einsendung zur Sequenzierung (Firma

GATC, Martinsried). Nach Überprüfung der Sequenzierdaten erfolgte die Transformation in den *A. fumigatus* Stamm  $\Delta\rho2\#7$  wie in 6.6.7 beschrieben. *Abbildung 4* zeigt den erfolgreich klonierten Vektor pDR003. Für die in 7.4.3 beschriebene Analyse der Integrationsanzahl via PCR wurden die Primer in Tabelle 4 verwendet..



*Abbildung 4* Karte des neu konstruierten Vektors pDR003. Der Vektor enthält im Unterschied zum bisherigen Komplementationsvektor für  $\Delta\rho2$  den hier grün markierten 3'-Bereich, es wurde also nach dem ORF von *rho2* 1009bp des 3'-UTR ergänzt. Entfernt wurde dabei der Bereich *his2A(t)*, da der ergänzte 3'-UTR als terminierender Bereich dient und die entstandene Sequenz 5'-rho2-3' mit 3126bp eine gute Länge zur homologen Rekombination aufweist. Im für die Transformation in *A. fumigatus* unerheblich „Rückgrat“ (engl. backbone) des Plasmids ist unter anderem eine Ampicillin-Resistenzkassette enthalten.

*Tabelle 4* Für die Erstellung der Komplementante  $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$  verwendete Primer

PCR # (siehe Abbildung)	Primer- Name	BasenSequenz	G/C-Anteil und Annealing- Temperatur	Fragmentgrö- ße
1	ptrA-5- rev	CGTTACCAATGGGATCCC G	19/11-59°C	3959bp
	Rho2- 3G1034	GGAGCAAACAAGATCGTC GAG	21/11-60°C	
	0- 5'UTRfw d			

2	Rho2-3G1034	GAACCACGACCACTTCGC	18/11	4429bp
	0-3'UTRre X		58,2°C	
	Ampicilli n-rev-Primer (usb)	GTCAGAAGTAAGTTGGCC GCAGTGTTATCACTCATG G	32/19 73°C	
3	ptrA-5-rev	CGTTACCAATGGGATCCC G	19/11-59°C	2051bp
	Rho2-3G1034	TGGCCTGAGTGGCC ATGGCTCAACAACAGAAT	21/10-58°C	
	0-3-fwdneu	GAC		
4	Rho2-3G1034	CCTGTCAACGACGAGCAT TC	20/11-59°C	3241bp
	0-3-revneu			
	Ampicilli n-rev-Primer (usb)	GTCAGAAGTAAGTTGGCC GCAGTGTTATCACTCATG GG	32/19 73°C	

### 6.6.5 Klonierung von Kassetten für konditionelle Mutanten

In AfS35 wurden die Promotoren von *rho2* durch einen Doxycyclin-induzierbaren Promoter ersetzt. Dies erfolgte durch den Einbau von konstruierten Kassetten über homologe Rekombination. Das Verfahren wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Vorarbeiten etabliert, welche auch publiziert wurden<sup>175</sup>.

Hierfür wurden die Bereiche des 5'-UTR sowie des Startbereichs von *rho2* (beginnend mit ATG) aus isoliertem Genom von AfS35 mittels PCR amplifiziert. Für den Startbereich des Gens (kodierender Bereich) wurde aufgrund einer geringeren Fehlerrate die *Pfu*-Polymerase genutzt, für alle anderen PCRs die *Taq*-Polymerase. Wie in Abbildung 5 B zu sehen wurden durch zwei der Primer am 3'-Ende des 5'-UTR sowie am 5'-Ende des Startbereichs Schnittstellen für das Restriktionsenzym SfiI eingefügt, um eine Ligation der Kassettenbestandteile zu ermöglichen.

Mittels Agarose-Gel wurden die PCRs auf die richtige Fragmentgröße überprüft und aufgereinigt. Dann erfolgte der Enzymverdau der einzelnen Fragmente mittels SfiI über Nacht bei 50°C und anschließend eine erneute Aufreinigung.

Ansatz Enzymverdau der PCR-Fragmente

SfiI	2µl
ddH <sub>2</sub> O	25µl
PCR-Produkt (5'-UTR bzw Startbereich)	18µl
10x Puffer	5µl

Anschließend wurde der Vektor JW 128 mittels Midiprep multipliziert und aufgereinigt. Dieser Vektor enthält die verwendete Kassette mit dem konditionellen Promoter oliC<sub>tet<sup>on</sup></sub> sowie einer Kassette für Pyrithiamin-Resistenz (ptrA). Es erfolgte der Verdau von PJW128 über Nacht mit SfiI bei 50°C. Der verdaute Vektor wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach der Auftrennung (erwartetes Fragment: 4110bp) ausgeschnitten und aufgereinigt.

Ansatz Enzymverdau von pJW128

SfiI	2µl
ddH <sub>2</sub> O	25µl
Vektor pJW128	18µl
10x Puffer	5µl

Nun erfolgte die Ligierung der PCR-Fragmente an die TetOn – Pyrithiamin – Resistenzkassette mittels T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C. Nach Aufreinigung und Ausschneiden des Ligationsprodukts aus einem Agarose-Gel wurde die erstellte Kassette zur Transformation im *Aspergillus fumigatus* Stamm AfS35 genutzt.

Ansatz Ligation

PCR-Fragment 1 (5'-Promoterbereich)	24µl
PCR-Fragment (Startbereich)	24µl
TetOn-Kassette	67µl
ATP	1µl
T4-DNA-Ligase	3µl
ddH <sub>2</sub> O	7
10x Puffer	14µl

Tabelle 5: Für die Erstellung der rho2-tet<sup>on</sup>-Mutante verwendete Primer

Primer- Name	BasenSequenz	Schnittstelle	G/C-Anteil und Annealing- Temperatur
-----------------	--------------	---------------	---

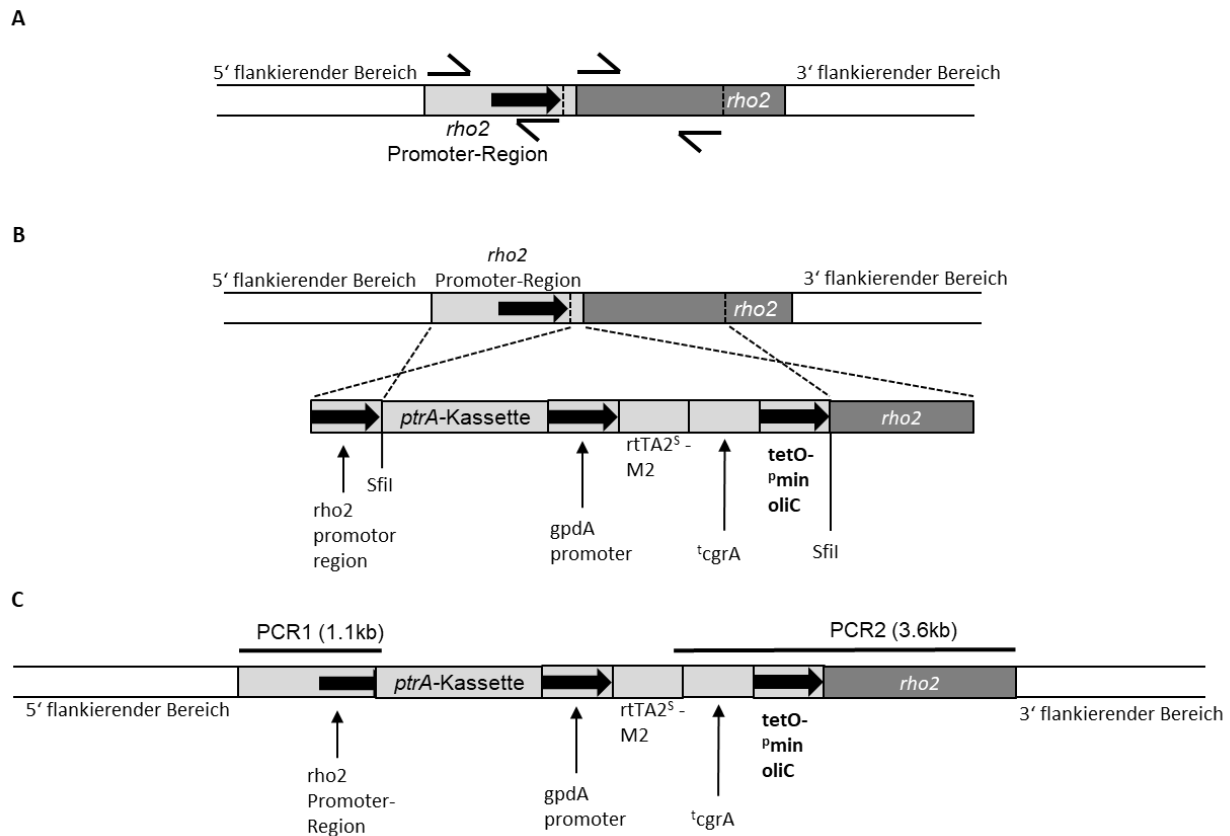
Rho2- 3G10340- 5'UTRfwd	TTGCGGCCGC GCTCTGTCTATCGTCCAGTC		20/11-59°C
Rho2- 3G10340- 5-revneu	CGGGCCATCTAGGCC GAGTGTGGAAGAAATTCGACC	Sfi1(b)	21/10- 58°C
Rho2- 3G10340- 3-fwdneu	T GGCCTGAGTGGCC ATGGCTCAACAACAGAATGAC	Sfi1(anti-a)	21/10- 59°C
Rho2- 3G10340- 3-revneu	CCTGTCAACG ACGAGCATTC		20/11- 59°C

### 6.6.6 Herstellung der konditionellen *rho2<sub>tetOn</sub>* Mutante

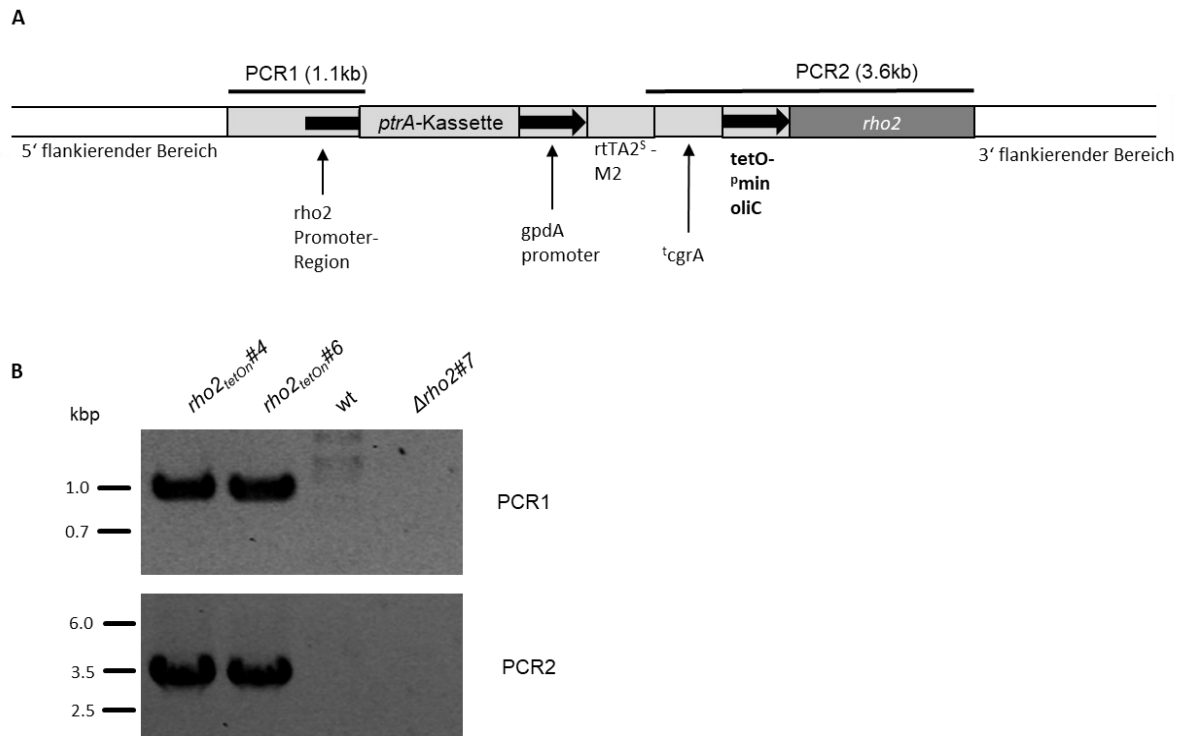
Nach Transformation des in Abbildung 5 und Abbildung 6 gezeigten Kassettenkonstruktes in den *Aspergillus fumigatus* Stamm AfS35 wurde die korrekte Integration mittels PCR überprüft. Dabei wurde zunächst das Genom der beiden für die Arbeit verwendeten Mutanten *rho2<sub>tetOn</sub>*#4 und #6 wie im Material- und Methodenteil beschrieben isoliert und anschließend zwei PCRs zur Kontrolle auf das Vorhandensein der Pyrithiamin-Resistenzkassette (PCR 1) bzw. des tetOn-Promoters an der korrekten Stelle vor *rho2* (PCR 2) durchgeführt (siehe Abbildung 6). Die beiden verwendeten Klone erwiesen sich dabei als korrekt.

Tabelle 6 Verwendete Primer zur PCR-basierten Bestätigung der konditionellen *rho2<sub>tetOn</sub>* Mutanten

PCR # (siehe Abbildung)	Primer- Name	BasenSequenz	G/C-Anteil und Annealing- Temperatur	Fragmentgröße
1	Rho2- 3G10340- 5-cast	TACCGGACTGGCCGAAGC	18/11-61°C	917bp
	ptrA-3- fwd	GTCCCGTATGTAACGGTGG	19/11-59°C	
2	tetOn- rtTA-fwd	CACCATGTCTAGACTGGACAAG	22/11-60°C	3431bp
	Rho2- 3G10340- 3-cast	CGAGACAGCTCGAGCTGC	18/12-61°C	



**Abbildung 5:** Übersicht über die wesentlichen Schritte und genetische Komponenten bei der Erstellung der konditionellen Mutante *rho2oliC<sub>tet<sup>on</sup></sub>*. **(A)** zeigt die Ansatzpunkte der in **Tabelle 5** aufgeführten Primer. In **(B)** sieht man die ligierte Kassette vor Integration in den Zielbereich an den gestrichelten Linien. **(C)** zeigt den genetischen Bereich nach erfolgter Integration. Vor *rho2* befindet sich nun der konditionelle oliC<sub>tet<sup>on</sup></sub> Promoter. In hellgrau dargestellt ist die eingebrachte Kassette, dunkelgrau dargestellt ist das Gen *rho2* (im Großteil bereits in der Kassette vorhanden), weiß sind flankierende Bereiche des Pilzgenoms. Diese Abbildung wurde für *rho2* modifiziert aus einer publizierten Arbeit unserer Arbeitsgruppe übernommen<sup>175</sup>.



**Abbildung 6 (A)** zeigt die Situation nach Integration der *rho2oliC<sub>tetOn</sub>*-Kassette in das Genom von AfS35. Eingezeichnet sind die nachgewiesenen PCR-Fragmente zur Kontrolle der korrekten Integration. Dieser Teil der Abbildung wurde modifiziert aus einer publizierten Arbeit unserer Arbeitsgruppe übernommen<sup>175</sup>. **(B)** zeigt die Kontroll-PCRs. In hellgrau dargestellt ist die eingebrachte Kassette, dunkelgrau dargestellt ist das Gen *rho2* (im Großteil bereits in der Kassette vorhanden), weiß sind flankierende Bereiche des Pilzgenoms.

### 6.6.7 Transformation in *Aspergillus fumigatus*

Die Transformation von *Aspergillus fumigatus* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sven Krappmann (Universität Würzburg) durchgeführt dass auf einem bereits publizierten Protokoll beruht<sup>176</sup>.

Für die Transformation wurden 300mL AMM mit 1mL einer frischen, dichten Sporensuspension angeimpft und über Nacht (ca. 16h) bei 180rpm und 37°C inkubiert. Dann wurde das Pilzmyzel über einen autoklavierten Filter ausgelegt mit Miracloth-Papier geerntet und anschließend mit Citratpuffer drei Mal gewaschen. Das trockene Myzel wurde in einem 200ml Erlenmeyerkolben mit 20ml Enzymlösung überführt und anschließend bei 30°C und 80rpm für 45min inkubiert. Danach wurden die Protoplasten über einen sterilen Miracloth-Filter in ein 50ml Falcon-Probengefäß geerntet und der



Filter anschließend mit STC1700 (4°C) gespült bis das 50ml Falcon gefüllt war. Die Protoplasten wurden ab diesem Zeitpunkt immer auf 4°C gehalten. Die gewonnen Protoplasten wurden bei 1500xg und 4°C für 12min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Protoplasten mit 50mL STC1700 gespült und erneut bei 1500xg und 4°C für 12min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten im restlichen STC1700 resuspendiert. Die resuspendierten Protoplasten wurden in ein oder mehrere vorbereitete 15ml Falcons gegeben, die 30µL Kassetten-DNA oder Plasmid DNA enthielten. Diese wurden für 30min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 250µl PEG4000-Mix hinzugefügt und die Falcons sanft geschüttelt. Anschließend wurde dieser Schritt wiederholt und als dritten Schritt 850µl PEG4000-Mix hinzugefügt und erneut sanft geschüttelt. Die Falcons wurden dann für 20min über Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie mit STC1700 aufgefüllt und die Protoplasten erneut bei 1500xg und 4°C für 15min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und die Protoplasten im restlichen STC1700 resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde 5ml Softagar (ca. 50°C) zugegeben, anschließend gemischt und dann auf eine Sorbitol-Platte ausplattiert. Die Sorbitol-Agarplatten enthielten ein Antimykotikum zur Selektion der Transformanten. Die Transformationsplatten wurden bei 37°C für ca. 3 Tage inkubiert bis Kolonien auf der Platte sichtbar waren.

Die folgenden Puffer wurden für die Transformation genutzt und vorher angesetzt.

Citratpuffer	
150mM KCl	22,36g
580mM NaCl	67,78g
50mM Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O	29,4g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 2L

Die Salze wurde in ca. 1500mL ddH<sub>2</sub>O gelöst, der pH auf 5,5 mit HCl eingestellt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf 2000mL aufgefüllt. Der Zitratpuffer wurde autoklaviert und danach bei Raumtemperatur aufbewahrt.

STC1700	
1,2M Sorbitol	218g
10mM TRIS pH 5,5	10mL von 1M TRIS pH5,5 mit HCl
50mM CaCl <sub>2</sub>	7,3g
35mM NaCl	2g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 1L

Die Salze und die TRIS-Lösung wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 1L aufgefüllt und anschließend autoklaviert. STC1700 wurde nach dem Autoklavieren bei 4°C aufbewahrt.

PEG4000-Mix

10mM Tris pH 7,5	1mL von 1M TRIS pH 7,5 mit HCl
50mM CaCl <sub>2</sub>	0,73g
60% (w/v) PEG4000	60g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 100mL

Die Substanzen wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 100mL aufgefüllt und dann autoklaviert.

Enzymlösung

1% (w/v) Vinotaste wurde in 20mL Zitratpuffer gelöst und anschließend steril filtriert mit einem 0,22µm Sterilfilter. Die Enzymlösung wurde für jede Transformation frisch hergestellt.

2x Sorbitol Agar

4 % (w/v) Bactoagar	20g
2 % (w/v) D-Glukose	10g
2,4M Sorbitol	218,2g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 500mL

Sorbitol, Bactoagar und D-Glukose wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 500mL aufgefüllt und autoklaviert. Um Agarplatten zu gießen wurde der Agar aufgeköcht und mit 2xAMM ohne Glukose 1:1 gemischt. Den Trafoplatten wurde das entsprechende Antimykotikum bzw. Doxycyclin hinzugefügt.

2x Softagar

2% (w/v) D-Glukose	5g
0,7% (w/v) Bactoagar	3,5g
1,2M Sorbitol	109g
	Auffüllen auf 250mL

D-Glukose, Bactoagar und Sorbitol wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 250mL aufgefüllt und autoklaviert. Vor der Verwendung wurde der 2xSoftagar aufgeköcht und 1:1 mit 2xAMM ohne Glukose gemischt. Anschließend wurde er bei 50°C warm gehalten bis zu seiner Verwendung

## 6.7 Isolation humaner Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus Blut gesunder, erwachsener Spender gewonnen. Die freiwilligen Spender wurden aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung. Eine Prüfung und Zulassung durch das Ethik-Komitee der LMU ist erfolgt (Aktenzeichen 519-95). Die Spende von Blut und die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki.

Die Isolation erfolgte mittels Erythrozyten-Sedimentation und anschließender Auftrennung der Leukozyten mittels Percoll-Dichtegradient. Zunächst wurden zwei 25ml-Spritzen mit 40µl Heparin (entspricht 5000IE/ml) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Blutabnahme mittels einer herkömmlichen Butterfly-Nadel (21G). Das Blut wurde unverzüglich auf sechs 15ml-Zentrifugenröhrchen gleichmäßig verteilt (ca. 7ml pro Röhrchen). Eines der sechs Röhrchen wurde für 10mins bei 1000G in einem Ausschwenkrotor zentrifugiert. Aus dem so entstandenen Plasma-Überstand wurden vorsichtig je 700µl entnommen und auf den Blutspiegel der anderen fünf Röhrchen übertragen, sodass eine möglichst getrennte Phase entstand. Die Röhrchen wurden nun für 80 bis 90mins stengelassen, um eine Sedimentation der Erythrozyten zu erlauben. Waren die Erythrozyten um mindestens 2ml je Röhrchen abgesunken, wurde der Zellüberstand der fünf Röhrchen vorsichtig auf die vorbereiteten drei Percoll-Gradientenröhrchen übertragen. Besonders geachtet wurde auf eine klar getrennte Phase des Zellüberstands über der 55%-Percoll-Schicht, und der 55%-Percoll-Schicht wiederum über der 74%-Percoll-Schicht. Nach dem Überschieben des Zellüberstands auf den Percoll-Gradienten wurden die Röhrchen bei 600G ohne Bremse für 20mins zentrifugiert, was einer Gesamtverweildauer von ca. 35mins in der Zentrifuge entsprach. Anschließend wurden Granulozyten in Form einer trübe Interphase zwischen der 54% und 74%-Percollschicht sichtbar. Diese Interphase wurde mittels einer 1ml-Pipette in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen mit 40ml vorgelegtem sterilem DPBS übertragen. Das Röhrchen wurde nochmals für 10mins bei 300G zentrifugiert, und anschließend der gesamte Überstand verworfen. Je nach Größe des Pellets wurden die Zellen in 1-3ml RPMI-Medium resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Hämozytometer, eine orientierende Vitalitätsbestimmung erfolgte mittels Trypanblau-Färbung (in aller Regel ergab sich eine Vitalität von >97%).

## 6.8 Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Experimente wurden mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Modell SP5, Leica Microsystems, Mannheim) durchgeführt. Das Mikroskop ist mit einer Inkubationskammer ausgestattet, in der neben Temperatur auch Atmosphärenzusammensetzung und Luftfeuchtigkeit reguliert werden können (verwendet wurden hierzu die Systeme The Cube, The Box und The Brick der Firma Life Imaging Services, Schweiz). Die Versuche mit lebenden neutrophilen Granulozyten (7.1.4) wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie in RPMI-1640 durchgeführt. Für die Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie mittels mitochondrialem GFP wurde ein 63x Objektiv mit Öl verwendet (Gesamtvergrößerung 630x). Für fluoreszenzmikroskopische Experimente wurden 8-well Kammern der Firma Ibidi (Martinsried) verwendet. Zur Bildaufnahme und -bearbeitung kam die Herstellersoftware von Leica LAS AF zum Einsatz.

Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurde ein Inversmikroskop des Typs Leica DM IRB verwendet (Leica Microsystems, Mannheim), um etwa schnelle direkte Einschätzungen über Zellzahl und -verteilung der später fluoreszenzmikroskopisch ausgewerteten Experimente in 8-well-Kammern (Ibidi) zu erhalten, oder lichtmikroskopische Fotos der in 96-well-Kammern bzw. 8-well-Kammern durchgeführten Experimente (siehe 7.1.2 und 7.1.6).

## 6.9 Fotografie

Für die Fotografie wurde eine Digitalfotokamera des Modells EOS 550D der Firma Canon (Tokyo, Japan) verwendet. Für die Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen wurde die Fotokamera hierzu mittels einem inversen Adapter des Typs Axiovert 25 (Carl Zeiss Microimaging, Göttingen) an das Lichtmikroskop angeschlossen. Für das Anfertigen von Fotografien für Tüpfeltests und radiäre Wachstumstests wurde ein Makroobjektiv (EF-S 60mm) verwendet.

## **6.10 Mikroskopische Vitalitätsbestimmung mittels mitoFLARE**

### **6.10.1 Vorbereitung und experimentelle Bedingungen**

Zu untersuchende Stämme wurden zunächst sofern in der Arbeitsgruppe noch nicht vorhanden wie bereits publiziert mit einem Vektor für mitochondriales GFP transformiert<sup>9</sup>(siehe auch 6.6.1).  $3 \times 10^3$  frische *Aspergillus fumigatus* Sporen wurden je well in 8-well Mikroskopie-Kammern (#80826; Firma Ibbidi, Martinsried) in je 300µl RPMI-1640 ausgesät und über 9,5h bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Proben wurden zuvor randomisiert und verblindet. Wenn indiziert, wurde Doxycyclin in entsprechender Konzentration zugegeben. Die Sporen keimten so unter mikroskopischer Wachstumskontrolle bis in das Stadium einer kleinen Hyphe aus. Dann wurden 100µl Medium je well entnommen und direkt anschließend H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angegebener Konzentration oder  $1,5 \times 10^6$  humane PMNs jeweils gelöst in 100µl RPMI-1640 (sofern indiziert mit Doxycyclin) zugegeben. Das Gesamtvolumen betrug somit 300µl. Die gewählte Anzahl an neutrophilen Granulozyten erreichte einen weitgehend homogenen Monolayer am Grund des Wells. Die Platte wurde nun für weitere 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde 60µl 25% PFA (Endkonzentration 3,8%) als Fixier- und 40µl CFW 10mg/ml (Endkonzentration 1mg/ml) als Färbemittel auf die im well befindlichen 300µl gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 10min wurden die gesamten 400µl vorsichtig abgenommen und durch 300µl DPBS ersetzt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung (s.u.). Bei Versuchen, in denen lebende Zellen benötigt wurden (Zeitreihenexperimente, Videoaufnahmen) wurde der Fixier- und Färbeschritt nicht durchgeführt und die 8-well-Platte direkt im vorgeheizten und entsprechend präparierten Mikroskop ausgewertet (s.o.). Kontrollgruppen (keine Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, keine Zugabe von Immunzellen) wurden in jedem Experiment mitgeführt.

### **6.10.2 Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie**

Zur Vorbereitung und Durchführung des Experiments siehe 6.10.1. In jedem der randomisierten und verblindeten wells wurden insgesamt 60 Hyphen direkt mittels inverser Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurde dabei ein 63x Objektiv (Gesamtvergrößerung 630x) sowie passendes Immersionsöl verwendet. Zur Auswertung wurden pro Gesichtsfeld alle Hyphen zunächst lichtmikroskopisch, dann

fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Fluoreszenzmikroskopisch entscheidend war die Bestimmung der mitochondrialen Morphologie mittels GFP-Fluoreszenz (es wurde ein gewöhnlicher GFP-Filter für inverse Fluoreszenzmikroskopie verwendet): Dabei wurden vitale Hyphen definiert als Hyphen, die in mehr als 60% ihres Hyphenkörpers tubuläre oder partiell fragmentierte Mitochondrien aufweisen. Konsekutiv wurden als avital solche gewertet, die eine komplett fragmentierte Mitochondrienmorphologie (mit und ohne sog. Clustering, s. Ergebnisteil) oder gar bereits (teilweise) erloschene Fluoreszenz aufweisen. Insbesondere für Hyphen mit bereits erloschener GFP-Fluoreszenz wurde dabei das Gesichtsfeld nach der Untersuchung im GFP-Kanal im Kanal für CFW-vermittelte Fluoreszenz (gewöhnlicher DAPI-Filter für inverse Fluoreszenzmikroskope) untersucht, um Hyphenzellwände zu identifizieren, die möglicherweise zuvor übersehen wurden. Nach Auswertung von 60 Hyphen pro well wurde die Überlebensrate bestimmt. Insgesamt wurden pro Experiment 3 wells oder mehr jeder Bedingung/jedes Stamms mitgeführt und ausgewertet.

Gelegentlich kam es bei den Experimenten mit neutrophilen Granulozyten vor, dass die Überlebensrate von *A. fumigatus* trotz eingehaltenem Versuchsprotokoll sehr deutlich von anderen Experimenten abwich. Dies ist am ehesten auf eine schwankende Aktivierungsrate bzw. je nach Spender unterschiedliche Grundaktivität der Immunzellen zurückzuführen. Um sinnvolle und valide Ergebnisse zu erhalten, setzten wir als Richtwert für die Überlebensrate des Wildtypstamms AfS35 gegenüber neutrophilen Granulozyten ohne Aktivierung durch Serum/LPS 30-90% fest. Experimente, die von dieser Überlebensrate abwichen wurden als ungültig betrachtet, da Störfaktoren vermutet wurden.

Die statistische Signifikanzberechnung erfolgte im Programm GraphPad Prism (Version 5) mittels Student's t-test (zwei-endig, unpaar) beim Vergleich zweier Stämme oder mittels one-way-ANOVA beim Vergleich mehrerer Stämme.

### **6.11 Metabolisch-colorimetrische Vitalitätsbestimmung mittels Resazurin**

Dieses Experiment wurde maßgeblich von Herrn Victor Brantl durchgeführt und stellt eine Abwandlung bereits publizierter Experimente dar<sup>177</sup>.  $1,5 \times 10^4$  in 100µl RPMI-1640 je well gelöste *Aspergillus fumigatus* Sporen wurden in 96-well Platten ausgesät und

für 10h bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Unter mikroskopischer Wachstumskontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angegebener Konzentration gelöst in 100µl RPMI-1640 zugegeben. Die Platte wurde anschließend für weitere 2h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, dann wurde das Medium vorsichtig abgezogen und ersetzt durch RPMI-1640 mit zugesetztem Resazurin in einer finalen Konzentration von 0,002% (w/v). Die Bestimmung des Resazurinumsatzes erfolgte mittels Fluoreszenzmessung (Exzitation 550-15nm, Dichrotom: 568,8 Emission und 590-20nm, Exzitation und Messung von oben; BMG Labtech, Ortenberg) unter fortgeführter Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die so gewonnenen Messwerte wurden in Excel exportiert und elektronisch ausgewertet. Entsprechende Kontrollgruppen (keine Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, keine Zugabe von Resazurin, Zugabe von Resazurin in leere wells ohne Sporen) wurden in jedem Experiment mitgeführt.

## **6.12 Tüpfeltest**

Für Tüpfeltests wurden in den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten AMM-Agarplatten (siehe 6.4.1.1) verwendet, bei denen während der Herstellung sofern benötigt und angegeben der Stressor CFW oder das für die Induktion konditioneller Promotoren verantwortliche Tetrazyklin Doxycyclin zugegeben wurde. Nach Trocknung der Platten wurden 3µl einer Sporenlösung mit einer entsprechend feinen Pipette auf vorgegebene Punkte in horizontale Reihen für jeden Pilzstamm in von links nach rechts absteigender Sporenkonzentration getüpfelt. Die verwendeten Sporenkonzentrationen in unseren Experimenten waren absteigend von links nach rechts  $5 \times 10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$ . Auf eine Agarplatte in Standardgröße (Petrischale) passen normalerweise sechs Reihen Tüpfel in vertikaler Richtung und sechs Tüpfel in horizontaler Richtung. Zwischen dem ersten und zweiten Tüpfel in horizontaler Richtung wurde bei nur fünf verwendeten verschiedenen Konzentrationen wie in den entsprechenden Bilder zu sehen ein Tüpfelpunkt ausgelassen. Für die simultane Testung von mehr als 6 Pilzstämmen wurden größere Agarplatten verwendet. Nach einer Inkubationszeit (in den entsprechenden Experimenten angegeben) bei 37°C wurden die Platten fotografiert. Kleine, auf dem Foto kaum sichtbare Mikrokolonien konnten dabei bei Bedarf lichtmikroskopisch untersucht werden, in dem die Agarplatte direkt in einem Durchlichtmikroskop untersucht wurde.

### 6.13 Radiärer Wachstumstest

Für dieses Experiment wurden  $1,5 \times 10^5$  in 3µl ddH<sub>2</sub>O gelöste Sporen auf AMM- bzw. Sabouraud-Agarplatten getropft und für 46h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten fotografiert und der Kolonieradius mittels einem Lineal ausgemessen. Das Experiment wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Die statistische Signifikanzberechnung erfolgte mittels one-way-ANOVA mit Tukey's post-test.

### 6.14 Infektionsversuch in *Galleria melonella*

Für diesen Versuch wurden kommerziell für den Anglersport verwendete Tiere der Gattung *Galleria melonella* stets vom gleichen Händler und (lt. Händlerangabe) vom gleichen Zulieferer sowie frisch (<24h Lagerperiode beim Händler) bezogen. Die Maden wurden gewogen und nach Gewicht in Gruppen sortiert: <0,2g, 0,2-0,3g, 0,3-0,4g, 0,4-0,5g und >0,5g. Nur Maden mit einem Gewicht von 0,2g-0,5g wurden für die Experimente ausgewählt und nach Gewichtsuntergruppen gleichverteilt zu je 10 Maden in Petrischalen gegeben. Eine Negativkontrollgruppe von 10 Maden wurde nicht beimpft und zur Seite gestellt. Die übrigen Madengruppen wurde nummeriert und anonymisiert mit den getesteten Stämmen ( $5 \times 10^5$  Sporen gelöst in 10µl ddH<sub>2</sub>O) bzw. als Impfkontrolle mit 10µl ddH<sub>2</sub>O beimpft. Die Maden wurden dabei auf einer festen Unterlage mit den Fingern sanft fixiert und dann mit einer 24 Gauge Injektionskanüle in den linken hintersten Fußfortsatz beimpft. Anschließend wurden sie im Dunklen in 10er Gruppen bei 37°C gehalten. Alle 8h erfolgte eine Zählung abgestorbener Maden und ggf. die Entfernung dieser aus dem Versuch. Sich verpuppende Maden wurden zensiert und aus dem Pool entfernt. Die Darstellung erfolgte mittels einer Kaplan-Mayer-Überlebenskurve. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Log-Rank (Mantel-Cox) Test.



## **6.15 Bioinformatische Methoden**

Zur Signifikanzberechnung und Erstellung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurde die Software GraphPad Prism (Version 5) verwendet.

Für molekulargenetische Methoden (Darstellung und Design von Vektoren, Primerdesign) kam die Software CLC Workbench 6 und Snap Geneviewer zum Einsatz.

Die Sichtung von Gendatenbanken und insbesondere das Abrufen von RNA-Sequenzierdaten erfolgte browserbasiert auf der Plattform [fungidb.org](http://fungidb.org) mithilfe des Browser-Tools JBrowse.

Zur Speicherung und Sichtung konfokalmikroskopischer Bilder verwendeten wir die Herstellersoftware LAS AF (Leica Microsystems, Mannheim).

Der Zuschnitt von Bildern und Abbildungen sowie die Beschriftungen erfolgten in PowerPoint (Version 2016, Microsoft, Redmond, USA).

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Etablierung eines neuen Assays zur Quantifizierung fungizider Effekte auf *A. fumigatus* Hyphen

#### 7.1.1 Oxidativer Stress verursacht Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks

Im Rahmen von Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass zytotoxische Bedingungen zu charakteristischen Änderungen der Mitochondrien-Morphologie führen<sup>9,10</sup>. Diese Veränderungen zeichnen sich insbesondere durch einen Zerfall des sonst tubulären Netzwerks in rundliche Strukturen aus, was Fragmentierung genannt wird<sup>9,10</sup>. In einer Bestimmung des Anteils von Hyphen mit intakter tubulärer Mitochondrien-Morphologie und solcher mit einem Zerfall des mitochondrialen Netzwerks wurde eine Möglichkeit gesehen, Stress und möglicherweise auch Vitalität auf der Ebene individueller Hyphen zu erkennen und zu quantifizieren.

Oxidativen Mechanismen werden bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* Hyphen durch neutrophile Granulozyten eine hohe Bedeutung zugesprochen (siehe 5.9)<sup>1,139</sup>. Zu Beginn sollte gezeigt werden, welchen Einfluss H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Auslöser von oxidativem Stress auf die mitochondriale Morphologie hat. Wie in Abbildung 7 zu sehen, führt eine Konzentration von 3mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer deutlichen Fragmentierung der Mitochondrien, beginnend nach etwa 30min Einwirkzeit und vollständig ausgeprägt nach etwa 50min. Zudem wird ein Wachstumsarrest der Hyphen beobachtet (hier nicht bildlich gezeigt, siehe auch 7.1.2).

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss verschiedener H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die mitochondriale Morphologie untersucht. Vor allem unter Einfluss niedriger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen kam es neben einer vollständigen Fragmentierung auch zu einer lediglich teilweisen Fragmentierung. Oft beobachtet wurde zudem neben einer vollständigen Fragmentierung eine zusätzliche Aggregation der fragmentierten Mitochondrien zu Haufen. Dies wird im Folgenden als „Clustering“ bezeichnet. Selten kam es zum kompletten Auslöschen der Fluoreszenz im Großteil einzelner Hyphenkörper (siehe hierzu auch Abbildung 11). Anhand der beobachteten

Veränderungen erfolgte nun die Einteilung der Hyphen in mehrere Gruppen (Abbildung 8 A und B):

1. Hyphen mit tubulärer mitochondrialer Morphologie
2. Hyphen mit teilweise fragmentierter mitochondrialer Morphologie
3. Hyphen mit komplett fragmentierter mitochondrialer Morphologie
4. Hyphen, die Clustering aufweisen
5. Hyphen, die über weite Strecken keine Fluoreszenz mehr aufweisen

In Abbildung 7 ist zu sehen, dass die teilweise Fragmentierung der Mitochondrien nach 30min hin zu einer kompletten Fragmentierung nach 50min einer zeitlichen Abfolge entspricht, also einzelne Schritte im Zerfall des mitochondrialen Netzwerks darstellen (siehe hierzu auch 7.1.4 sowie Abbildung 8 B). Die meisten der Abbildungen in den folgenden Kapiteln sind unter meiner Erstautorschaft publiziert worden und wurden für die Anfertigung der Dissertation meist nur leicht verändert<sup>178</sup>. Entsprechende Hinweise finden sich in den Bildunterschriften.

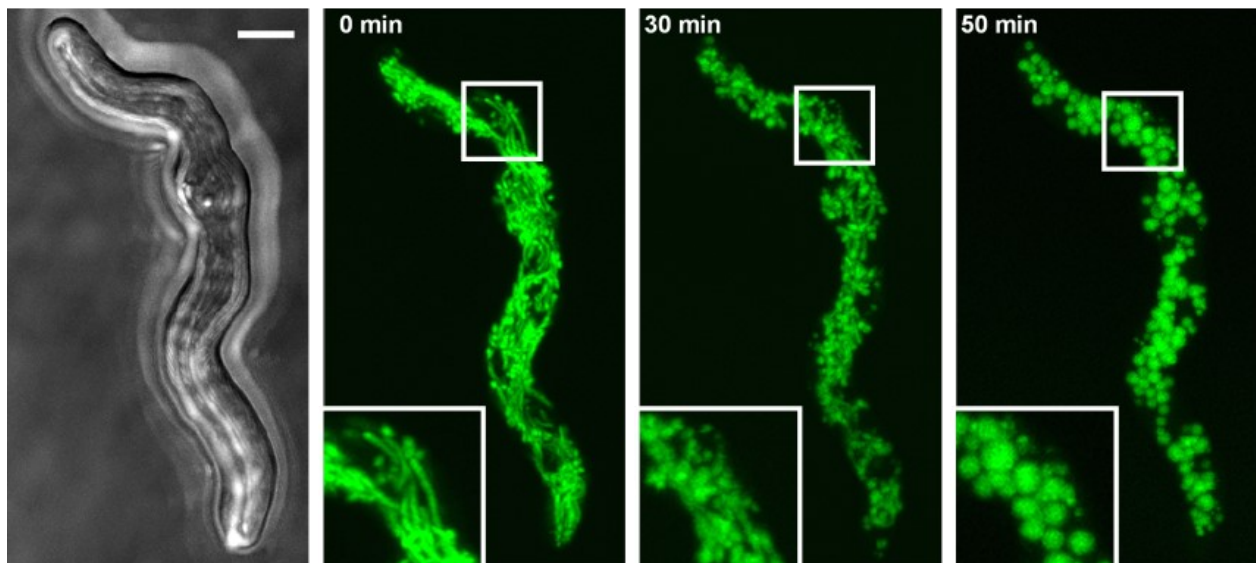
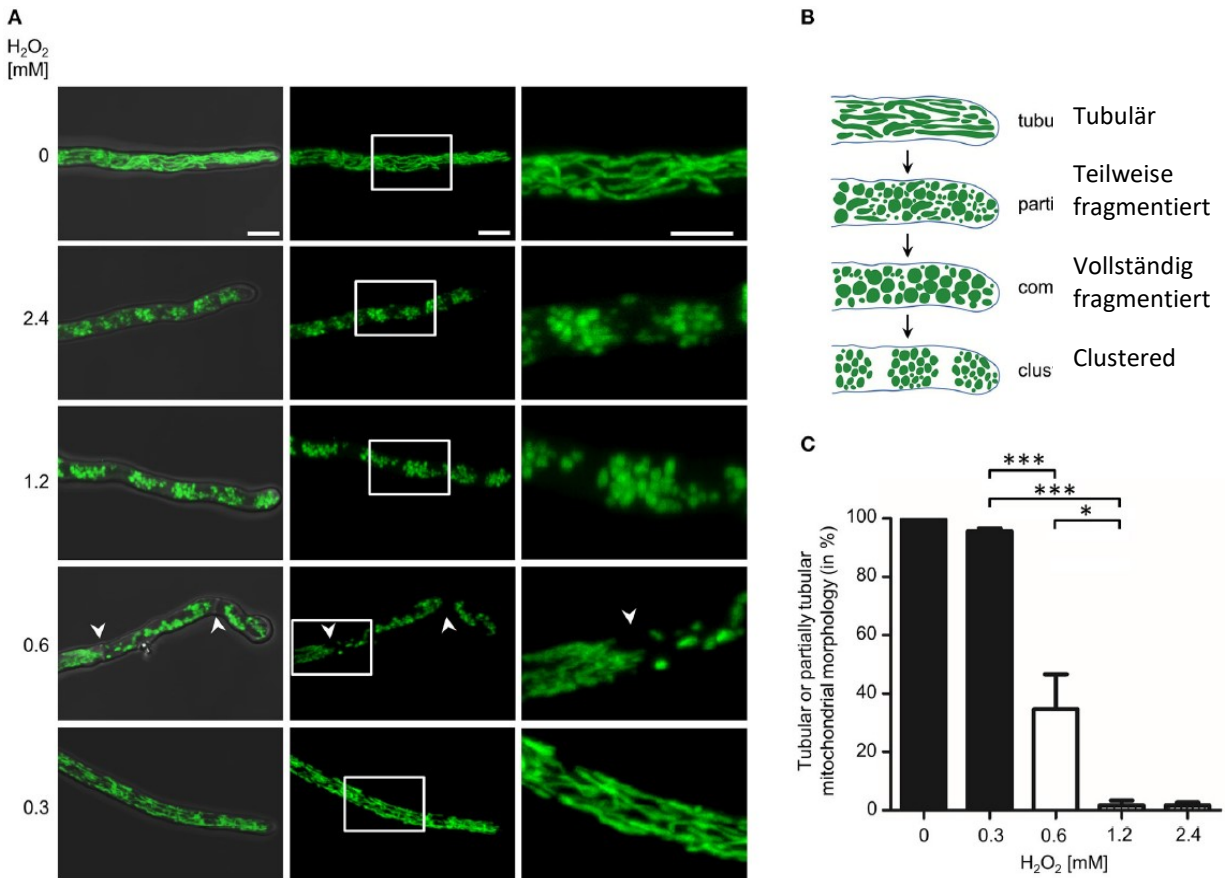


Abbildung 7: Einfluss von  $H_2O_2$  auf das mitochondriale Netzwerk. Links abgebildet ist ein Bild der Lichtmikroskopie, die drei rechten Bilder sind GFP-Fluoreszenzbilder, jeweils als Schichtaufnahmen. Mitochondriales GFP exprimierende *A. fumigatus* Hyphen wurden in AMM angeimpft. Nach 10 Stunden Inkubationszeit wurde dem Medium 3mM  $H_2O_2$  zugefügt und über die Zeit wurden mehrere Bilder mittels einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Der Eichbalken repräsentiert 4µm. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 1,2mM und mehr verursachen innerhalb von 2h eine komplette Fragmentierung/Clustering/Auslöschen des mitochondrialen Netzwerks in >95% der beobachteten Hyphen (Abbildung 8 A und C). 0,6mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachte vollständige Fragmentierung/Clustering/Auslöschen der Fluoreszenz in 60-70% der Hyphen, eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,3mM führte zu keinen signifikanten Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks (Abbildung 8 A und C).

Auffällig ist vor allem unter Einfluss von 0,6mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dass sich gelegentlich (<10% der affektierten Hyphen) Hyphen nicht im gleichem Ausmaß betroffen präsentierten: Es wiesen innerhalb der gleichen Hyphen Teile tubuläre, andere Teile fragmentierte Mitochondrien oder Mitochondrien mit Clustering auf. Zu erklären ist dies vermutlich durch die natürliche Unterteilung der Hyphen in Kompartimente durch Septenbildung, wodurch funktionell unabhängige Hyphenabschnitte entstehen, die im Einzelfall unterschiedliche mitochondriale Morphologien aufweisen können.

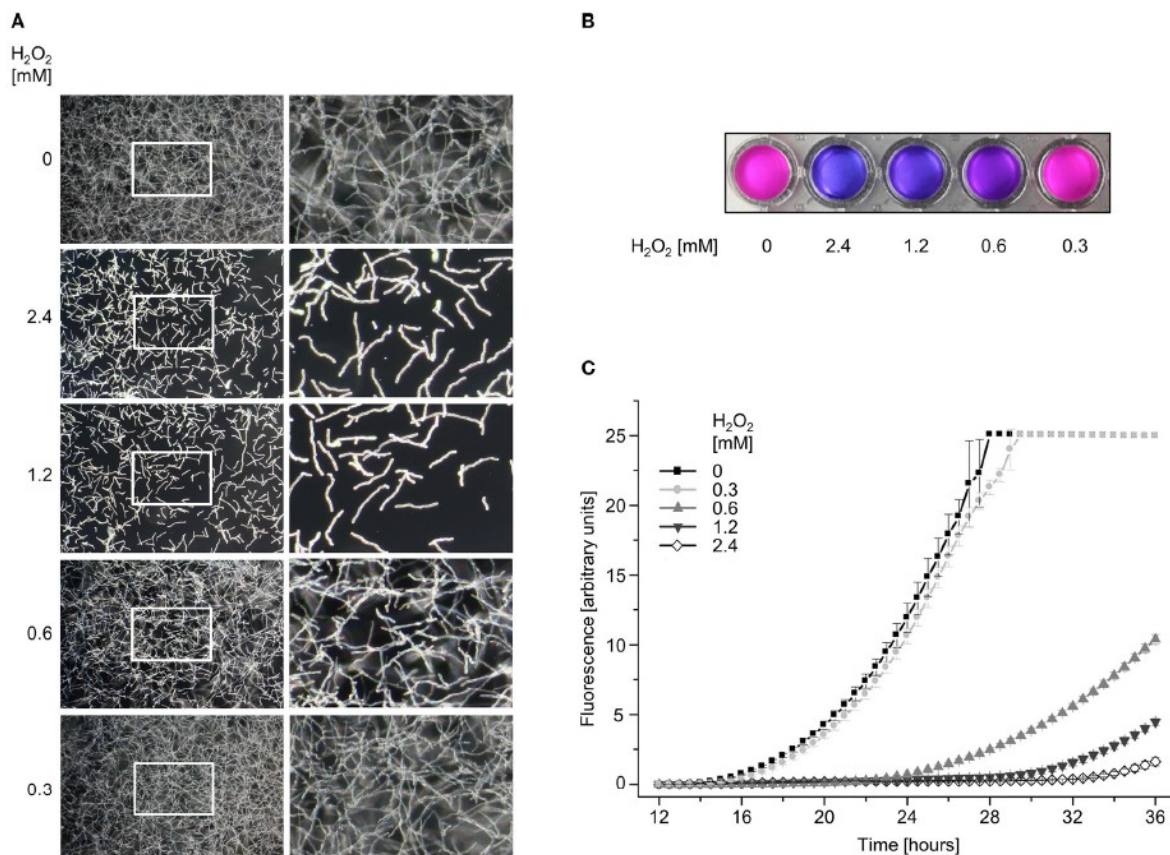
Da es somit mitunter zu Problemen führte, die Hyphen eindeutig in Morphologie-Gruppen zu unterteilen, erfolgte aus Praktikabilitätsgründen die Festlegung, dass Hyphen in mindestens 60% des Hyphenkörpers tubuläre bzw. teilweise fragmentierte Mitochondrien aufweisen müssen, um als nicht- bzw. minimal-affektiert zu gelten. Folglich galten Hyphen nur dann als affektiert, wenn sie in mindestens 60% des Hyphenkörpers komplett fragmentierte Mitochondrien bzw. Clustering bzw. keine Fluoreszenz mehr aufweisen. In diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen ist, dass ohne Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur ein sehr geringer Anteil (<1%) der Hyphen keine GFP-Fluoreszenz aufweisen. Dies wurde mehrfach in Vorversuchen vor den eigentlichen Experimenten überprüft.



**Abbildung 8** Auswirkung unterschiedlicher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die Mitochondrienmorphologie **(A,C)** Mitochondriales GFP exprimierende Sporen von *A. fumigatus* wurden im Medium RPMI-1640 unter 37°C inkubiert. Nach 10h wurde die angegebene Menge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben, nach weiteren 2h wurden die Proben fixiert und mikroskopiert. **(A)** Mittels einem konfokalen Lasermikroskop wurden lichtmikroskopische sowie fluoreszenzmikroskopische Bilder als Schichtaufnahmen angefertigt. In der linken Spalte abgebildet zu sehen sind übereinandergelagerte Bilder aus Licht- und Fluoreszenzmikroskopie. In der mittleren Spalte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, in der rechten Spalte sind die weißen Rechtecke vergrößert dargestellt. Pfeile weisen auf Septen hin (in der Lichtmikroskopie zu erkennen). Die Eichbalken (gültig für jeweils die gesamte darunterliegende Spalte) repräsentieren 5µm. **(B)** Schemazeichnung typischerweise beobachteter mitochondrialer Morphologieänderungen unter oxidativem Stress: tubulär, teilweise fragmentiert, vollständig fragmentiert, clustered. **(C)** Mikroskopsich-quantitative Auswertung des Anteils tubulärer sowie teilweise fragmentierter Hyphen (in >40% des Hyphenkörpers, siehe Material und Methoden). Statistische Signifikanzberechnungen (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) wurden mittels einem ungepaarten Student's t-test durchgeführt (Annahme ungleicher Varianzen). Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

### 7.1.2 Mitochondriale Fragmentierung korreliert mit Zelltod individueller Hyphen

Die in 7.1.1 erläuterten Ergebnisse legen nahe, dass gezeigte Änderungen der Mitochondrienmorphologie (Fragmentierung und Clustering) sowie das Auslöschen der Fluoreszenz eine Visualisierung fungizider Effekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$  darstellen. Um zu



**Abbildung 9:** Resazurin-basierte Untersuchung der Zellviabilität unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (A) Dunkelfeld-Mikroskopie unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 24h, die rechte Spalte repräsentiert Vergrößerungen der Rechtecke der linken Spalte. Zunächst wurden *A. fumigatus* Wildtypsporen in 96-well Platten in RPMI-1640 Medium gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 10h wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  der in der Abbildung angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Nach 2 weiteren Stunden wurde das gesamte Medium abgesogen und ersetzt mit frischem RPMI-1640 ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (B,C) Zunächst wurden *A. fumigatus* Wildtypsporen in 96-well Platten in RPMI-1640 Medium gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 10h wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  der in der Abbildung angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Nach zwei weiteren Stunden wurde das Medium abgesogen und ersetzt durch frisches RPMI-1640 ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Resazurin. Dann wurden die Platten bei 37°C inkubiert. (B) Bilder der 96-well Platten mit Resazurin nach 24h Inkubation. Je rosafarbener das well, desto mehr Resazurin wurde umgesetzt (folglich desto mehr Stoffwechselaktivität). (C) Aufzeichnung der Resofurin-Fluoreszenz über den angegebenen Zeitraum mittels einem Plattenlesegerät. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen dreier technischer Replikate. Die für diese Abbildung benötigten Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Victor Brantl (Arzt, Medizindoktorand) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

überprüfen, ob Hyphen unter Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  noch vital sind, bedienten wir uns der Metabolismus-basierten Resazurin-Methode. Die zentrale Fragestellung war hierbei, inwiefern zuvor beobachtete Effekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Mitochondrienmorphologie Rückschlüsse auf das dauerhafte Überleben und die Viabilität von *A. fumigatus* zulassen, also der Hypothese nachzugehen, inwieweit beobachtete Veränderungen der mitochondrialen Morphologie (Abbildung 8 A und B) mit Graden der Affektion bis hin zum Zelltod korrelieren. Die für Abbildung 9 benötigten Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Victor Brantl (Arzt, Medizindoktorand) durchgeführt.

Hohe Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,2mM und 2,4mM) sind in der Lage, das weitere Pilzwachstum auch nach Hinzugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -freiem Medium beinahe vollständig zu unterdrücken, sichtbar an den beinahe vollständig abgeflachten Wachstumskurven (Abbildung 9 B und C). In hier nicht gezeigten Experimenten wurde nachgewiesen, dass auch nach einer verlängerten Inkubation über mehrere Tage hinweg weniger als 5% der Hyphen Wachstum aufwiesen, es ist somit aller Wahrscheinlichkeit nach von einem Zelltod von >95% der Hyphen auszugehen. Sehr wenige überlebende Hyphen reichen jedoch aus, die Probengefäße nach langer Inkubationsdauer vollständig zu überwuchern, was die Fotodokumentation der Probengefäße nach sehr langer Inkubationsdauer erheblich erschwert: Gäbe es keine Fotos nach einem früheren Zeitpunkt (hier: 24h, Abbildung 9 A), könnte man nicht zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  – exponierten Wells und solchen ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  unterscheiden. Unter Einfluss von 0,6mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde optisch geschätzt etwa die Hälfte der Hyphen getötet (Abbildung 9 A), wobei ein genaues Auszählen zur Quantifizierung nicht möglich war. 0,3mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte kaum zu geändertem Überleben oder Wachstumsgeschwindigkeit (Abbildung 9 A, B und C).

Die Ergebnisse dieses Experiments stimmen insgesamt sehr gut mit dem beobachteten Anteil mikroskopisch in der Mitochondrienmorphologie veränderter Hyphen (siehe Abbildung 8 C) überein.

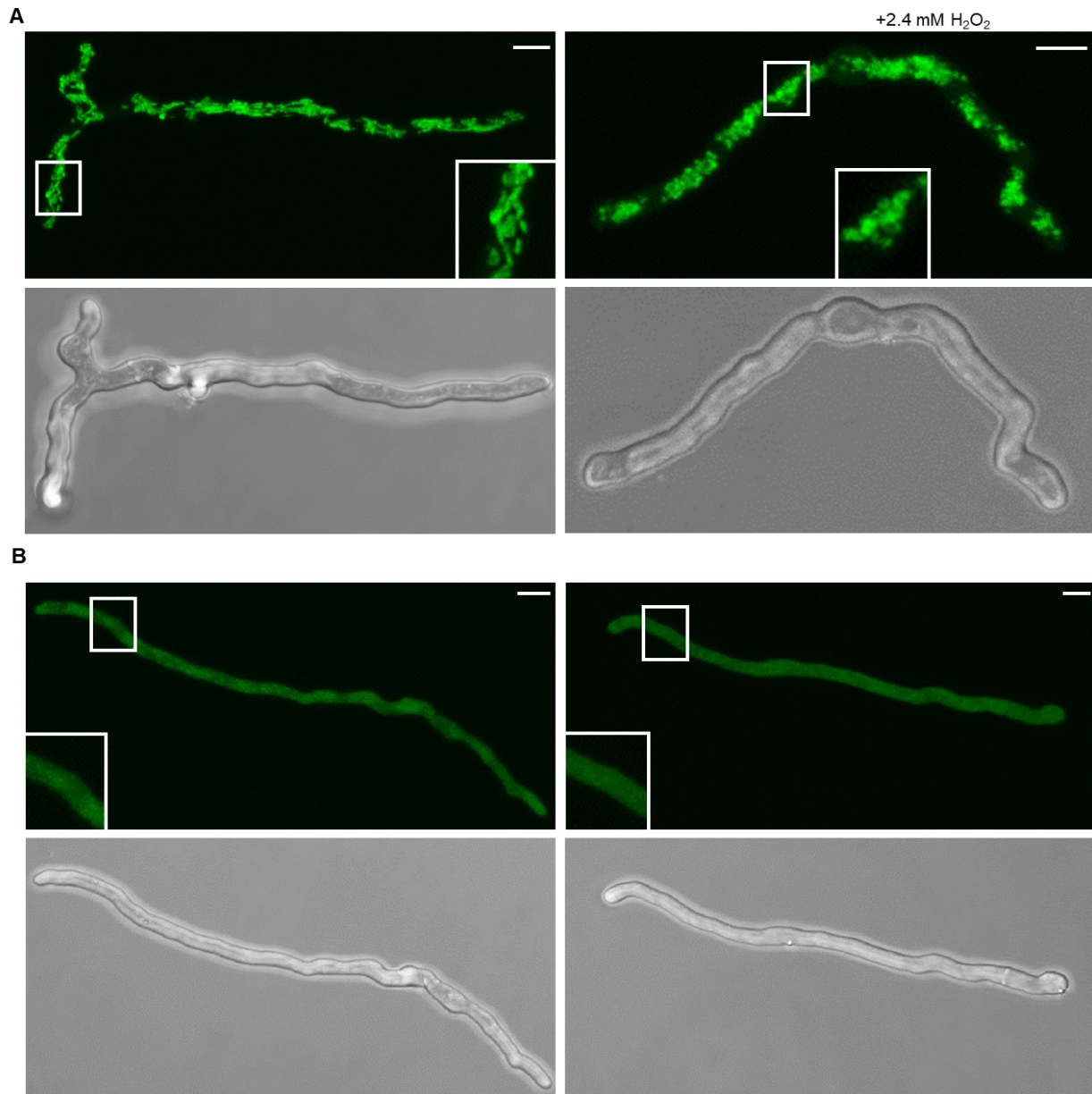
Zusammenfassend wird festgestellt, dass die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  hervorgerufenen Änderungen im mitochondrialen Netzwerk direkt mit einem Zelltod der Pilzhypen korrelieren.

### **7.1.3 Cytosolisches GFP ist mitochondrialem GFP als Marker fungalen Überlebens unterlegen**

In Anbetracht der bereits etablierten FLARE-Methode<sup>170</sup> (siehe hierzu 5.10), welche auf cytosolische Fluoreszenz in *A. fumigatus* Sporen basiert, ist eine berechnigte Fragestellung, ob cytosolisches GFP unserer neuen, auf mitochondriales GFP basierenden Methode nicht gleichwertig ist. Eine Methode, die zur Lebend/Tot-Differenzierung von *A. fumigatus*-Hyphen nur die Qualitäten „vorhandene“ oder „erloschene“ cytosolische Fluoreszenz benötigt, wäre im Vergleich zur nötigen Quantifizierung von Gruppen anhand der vorhandenen mitochondrialen Morphologie deutlich einfacher.

Die in 7.1.1 und 7.1.2 beschriebenen Experimente mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei *A. fumigatus* Hyphen wurden mit cytosolischem GFP im Vergleich zu den bisher verwendeten Hyphen mit mitochondrialem GFP durchgeführt. Wie in Abbildung 10 erkennbar ist, wiesen Hyphen mit cytosolischem GFP unter Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in fungizider Konzentration (2,4mM) noch eine deutliche Fluoreszenz auf (Abbildung 10 A), während Hyphen mit mitochondrialem GFP eindeutig die in 7.1.1 und 7.1.2 erläuterten Veränderungen der mitochondrialen Morphologie zeigten (Abbildung 10 B). Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des cytosolischen GFP unter Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war mit bloßem Auge in unseren Versuchen nicht zu erkennen. Auch schien die Intensität von Fluoreszenz als Differenzierungsqualität ohnehin kaum geeignet, da die Intensität der GFP-Fluoreszenz stark von der Dauer der bereits stattgehabten Exposition gegenüber Fluoreszenzlampe bzw. Laser der jeweiligen Region im Probengefäß beeinflusst wird und sich in toten, bereits fixierten Hyphen nach kurzer Zeit zunehmend erschöpft. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass cytosolisches GFP in der Fragestellung von Vitalität und Überleben mitochondrialem GFP unterlegen war.





**Abbildung 10:** Vergleich von cytosolischem GFP zu mitochondrialem GFP unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zu sehen ist die unter fungizider  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration deutlich affizierte Mitochondrienmorphologie bei im Kontrast dazu weitgehend unveränderter cytosolischer Fluoreszenz. Für dieses Experiment wurden *A. fumigatus* Sporen mit Expression von mitochondrialem (A) oder cytosolischem (B) GFP in RPMI-1640 im gleichen Probengefäß ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 10h erfolgte sofern angegeben die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer finalen Konzentration von 2,4mM. Nach weiterer, zweistündiger Inkubation wurden die Proben fixiert und mittels eines Konfokallasermikroskops ausgewertet. Gezeigt sind exemplarische Schichtbilder ausgewählter Hyphen. Die untere Zeile von (A,B) zeigt lichtmikroskopische Referenzbilder. Der Eichbalken repräsentiert 5µm. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

#### **7.1.4 Granulozyten induzieren eine irreversible mitochondriale Fragmentierung**

Es wird angenommen, dass die ROS-Produktion von neutrophilen Granulozyten einen wichtigen Beitrag zu deren antimikrobiellem Potenzial leistet (siehe 5.9). Die bisher im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente verwendeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Modell für die ROS-Produktion von neutrophilen Granulozyten.

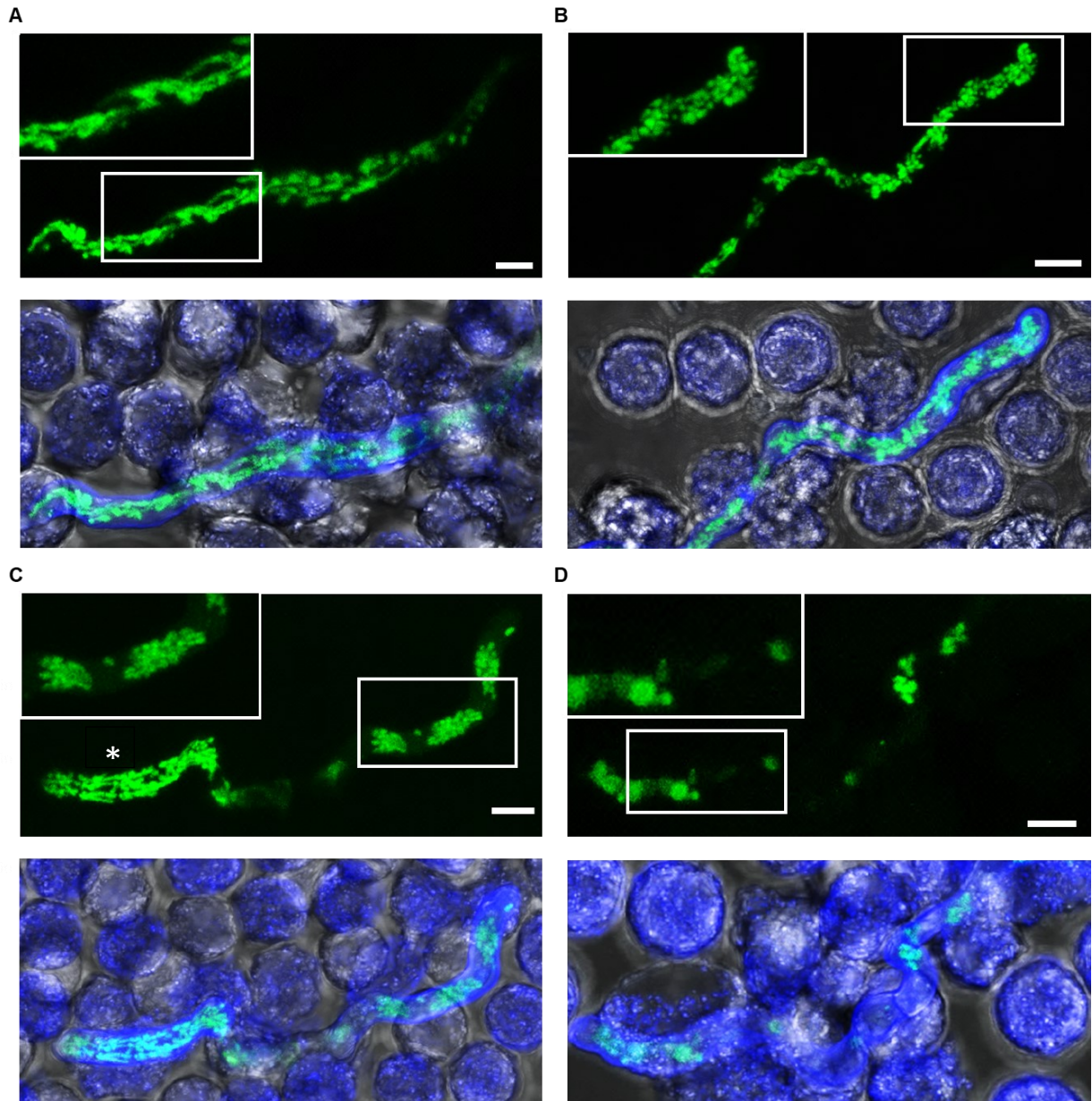
Um den Effekt von PMNs auf die mitochondriale Morphologie von *A. fumigatus* zu überprüfen, wurden Hyphen mit aus humanem Blut isolierten Granulozyten konfrontiert. Als Expositionsdauer wurde nach entsprechenden Vorversuchen 2 Stunden gewählt. Bei kürzerer Exposition wies ein Großteil der Hyphen gar keine, einige wenige erst beginnende mitochondriale Veränderungen auf (siehe hierzu auch 7.1.5 und Abbildung 15 A). Neben einer gewissen Latenz, bis sich schädliche Einflüsse wie oxidativer Stress auf mitochondriale Morphologien auswirken ist dies vermutlich auch darauf zurückzuführen, dass hinzugefügte PMNs eine gewisse Zeit benötigen in der geänderten Umwelt nach Zugabe in das mit *A. fumigatus* beimpfte Probengefäß aktiv zu werden, sich an die Hyphenkörper anzulagern und mit der Pilzbekämpfung zu beginnen. Bei längerer Exposition beginnen weniger bis gar nicht affizierte Hyphen durch starkes Wachstum (ein ab einer gewissen Hyphengröße zunehmend exponentielles Wachstum gilt es dabei zu bedenken) bereits abgetötete oder schwer affizierte Hyphen zu überwuchern und deren Zählung somit zu verfälschen.

Nach 2 Stunden wiesen viele Hyphen weiterhin tubuläre oder leicht fragmentierte Mitochondrien auf (Abbildung 11 A und B). Andere Hyphen zeigten sich komplett fragmentiert, wobei diese meistens zumindest in einigen Kompartimenten ein deutliches mitochondriales Clustering aufwiesen (Abbildung 11 B). Immer wieder zu finden waren auch Hyphen mit teilweise bereits ausgelöschter Fluoreszenz, wobei diejenigen Kompartimente mit noch erhaltener Fluoreszenz dann oftmals wenige, große, „sphärisch“ anmutende Mitochondrien aufwiesen (Abbildung 11 D). Gelegentlich zu finden waren auch Hyphen, welche offensichtlich eine Art des Lyseprozesses durchlaufen hatten, da sich wolkenförmig nach extrazellulär auslaufende Fluoreszenzen fanden (Abbildung 13 vierte Bilderspalte, mit Pfeil markiert).

Festzuhalten ist an dieser Stelle, dass PMNs sehr ähnlich zu den Beobachtungen bei  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe 7.1.2) eine Vielzahl mitochondrialer Morphologieänderungen in *A. fumigatus* auslösen. Eine semiquantitative Übersicht über die häufigsten Veränderungen unter verschiedenen – teilweise in Folgekapiteln erwähnten – Einflüssen gibt Abbildung 12.

Die exemplarisch gezeigte Hyphe in Abbildung 13 (über 270 Minuten) sowie angefertigte mikroskopische Videoaufnahmen belegen, dass – analog zu den Beobachtungen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe 7.1.2) Hyphen mit kompletter mitochondrialer Fragmentierung, mitochondrialem Clustering oder Auslöschen der Fluoreszenz sich auch über einen Zeitraum von >20h nicht erholten und kein Wachstum mehr aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten Hyphen in Videoaufnahmen mit tubulärer oder nur teilweise fragmentierter mitochondrialer Morphologie unbeeinträchtigtes weiteres Wachstum (nicht gezeigt).

Im Unterschied zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird bei Versuchen mit PMNs beobachtet, dass es neben den schwer affizierten Hyphen auch viele Hyphen gibt, die noch eine vollständig tubuläre oder allenfalls leicht fragmentierte Mitochondrien aufweisen. Es zeigt sich insgesamt im Well eine höhere Diversität der mitochondrialen Morphologie. Dies könnte vermutlich durch die im Gegensatz zum in homogener Konzentration im Well vorliegenden  $\text{H}_2\text{O}_2$  ungleiche Verteilung der Granulozyten bzw. des PMN/Hyphen-Verhältnisses in der Probenkammer zu erklären sein: Beispielsweise wurde in unseren Experimenten beobachtet, dass sowohl die Dichte an PMNs als auch an Hyphen im Zentrum des Wells niedriger war als am Rand, eine komplett homogene Verteilung wurde nur selten erreicht. Eine weitere Beobachtung ist, dass das Phänomen des Clustering insgesamt häufiger als bei  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufzutreten scheint.



**Abbildung 11:** *A. fumigatus* Hyphen nach zweistündiger Aussetzung gegenüber PMNs. *A. fumigatus* Sporen mit mitochondrialem GFP wurden in RPMI-1640 ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 10h erfolgte die Zugabe von PMNs und eine gemeinsame weitere Inkubation für 2h. Danach wurden die Proben fixiert und gefärbt mit CFW (Chitinfärbung zur Sichtbarmachung der Pilzzellwände). Anschließend angefertigt wurden Mikroskopiebilder (als Schichtaufnahmen) folgender Qualitäten: Lichtmikroskopie, GFP-Fluoreszenz, CFW-Fluoreszenz. Abgebildet sind Bilder der GFP-Fluoreszenz (obere Zeile **A-D**) sowie ein overlay aus allen drei Qualitäten (untere Zeile **A-D**). Ausgewählt wurden exemplarisch eine Hyphe mit (**A**) tubulärer (**B**) teilweise fragmentierter (**C**) komplett fragmentiert und geclustert sowie (**D**) fragmentierter und teilweise ausgelöschter Fluoreszenz. In (**C**) markiert ein Stern ein noch vitales Kompartiment einer insgesamt zum Großteil (>60%) fragmentiert und geclustert und damit als tot gewerteten Hyphe. In allen Bildern gut zu erkennen ist die dichte Anlagerung von PMNs an die Hyphen mit teilweise amöbenartiger Umfließung. Der Eichbalken repräsentiert 4µm. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

Zusammengenommen mit den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Experimenten aus 7.1.1 und 7.1.2 belegen nun diese Versuche, dass PMNs im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  sehr ähnliche Veränderungen der Mitochondrien-Morphologie in *A. fumigatus* Hyphen hervorrufen, sowie dass eine vollständige Fragmentierung, ein Clustering, sowie ein Erlöschen der Fluoreszenz mit einem Untergang der entsprechenden Hyphen bzw. Hyphenteile gleichzusetzen ist. Damit scheint es möglich, anhand der Quantifizierung mitochondrialer Morphologien eine Abtötungsrate von *A. fumigatus* zu bestimmen.

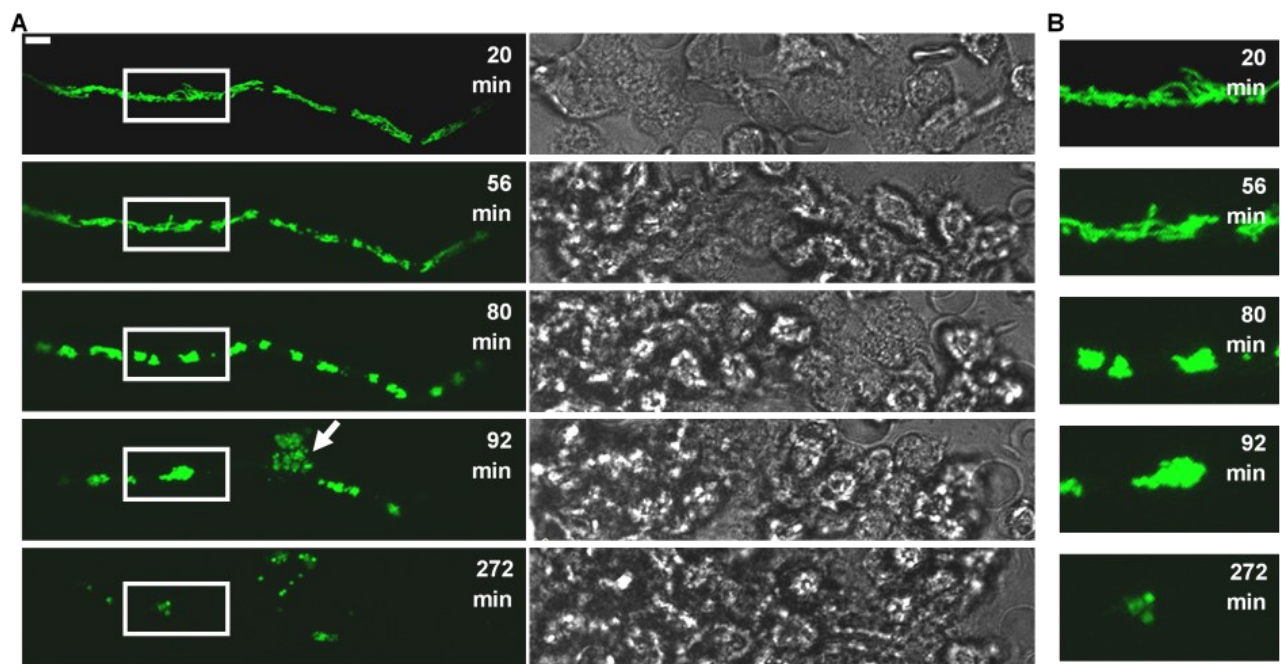
Die in der Theorie einfach imponierende Einteilung der mitochondrialen Morphologie wird dadurch erschwert, dass in einigen Hyphen (exemplarisch Abbildung 11 C) mehrere der oben genannten und in Abbildung 12 zusammengefassten

	tubuläre Mitochondrien	teilweise fragmentierte Mitochondrien	vollständig fragmentierte und sphärische Mitochondrien	fragmentierte Mitochondrien mit Clustering	Beginnende Auslöschung der Fluoreszenz	Beginnende Auslöschung der Fluoreszenz mit Zellyse	keine Fluoreszenz
kein stress	+++	(+)	-	-	-	-	-
0.6 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	+	+	+	+	+	(+)	+
2.4 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	-	-	++	+	+	(+)	++
PMNs	+	++	(+)	++	++	(+)	+
PMNs + LPS oder PMNs + serum	(+)	+	(+)	+++	+++	+	+
LPS/serum	+++	(+)	-	-	-	-	-

**Abbildung 12:** Übersichtstabelle über die am häufigsten beobachteten mitochondrialen Morphologien unter verschiedenen Einflussfaktoren. Die links aufgeführten Stressoren wirkten jeweils 2h auf die Hyphen (siehe entsprechende Experimente). +++ entspricht den meisten Hyphen, ++ entspricht vielen Hyphen, + entspricht einigen Hyphen, (+) entspricht sehr wenigen Hyphen, - entspricht keinen Hyphen. Unter Normalbedingungen sind Hyphen ohne tubuläre mitochondriale Morphologie eine Seltenheit, es treten allenfalls teilweise fragmentierte Mitochondrien auf. Während unter milden Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  alle dargestellten Morphologien zu beobachten sind, treten unter fungizide Konzentrationen (2,4mM) keine Hyphen mit tubulären oder teilweise fragmentierten Mitochondrien mehr auf. Aus den Gesamtergebnissen dieser Arbeit erfolgte die Schlussfolgerung, dass tote oder sterbende Hyphen vollständige mitochondriale Fragmentierung, Clustering oder eine beginnende Auslöschung der Fluoreszenz aufweisen. Das Phänomen der erloschenen Fluoreszenz tritt unter Einfluss von PMNs häufiger auf als unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Eine Zellyse mit extrazellulär zu beobachtender mitochondrialer Fluoreszenz war gelegentlich zu beobachten. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.



mitochondrialen Morphologien gemeinsam nebeneinander auftreten. Eine Erklärung hierfür ist die Septenbildung, die es dem Pilz erlaubt, verschiedene Kompartimente als funktionell unabhängige Abschnitte wachsen zu lassen. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bereits unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe 7.1.2) beobachtet, trat unter Einfluss von Granulozyten aber häufiger auf. Ein Grund hierfür ist vermutlich erneut die im Gegensatz zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  ungleiche Verteilung der PMNs im Well. Hinzu kommt die nur begrenzte Fähigkeit der humanen Zellen, sich im dreidimensionalen Raum zu bewegen. Damit ist es zu erklären, dass gewisse Hyphenabschnitte unbehelligt bleiben. Um diesem Problem zu begegnen, wurde – erneut analog zu den Versuchen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe 7.1.2) – aus Praktikabilitätsgründen die Definition festgesetzt, dass Hyphen dann als vital gewertet werden, wenn >60% des Hyphenkörpers eine tubuläre oder lediglich teilweise bestehende Fragmentierung aufweisen.



**Abbildung 13** Von PMNs attackierte *A. fumigatus* – Hyphe über einen Zeitraum von 272min. Analog zu den bisherigen Versuchen wurden Sporen, welche mitochondriales GFP exprimieren in RPMI-1640 ausgesät und für 10h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von PMNs und Lipopolysaccharid(200ng/ml). Unter laufender Mikroskopie im Sinne eines live cell imaging wurden in regelmäßigen Zeitabständen Fluoreszenz- sowie Lichtmikroskopiebilder als Schichtbilder aufgenommen. **(A)** zeigt ebensolche Schichtaufnahmen. Der Pfeil zeigt eine stattgefundenen Zell-Lyse mit nach extrazellulär verlagerter Fluoreszenz. Der Eichbalken repräsentiert 10µm. **(B)** zeigt Vergrößerungsaufnahmen der in **(A)** markierten weißen Rechtecke. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

Unter den so festgelegten Bedingungen wurden je Well eines Probengefäßes 180 Hyphen gezählt und ausgewertet. Die Färbung durch Calcofluorweiß (CFW, darstellbar mittels Fluoreszenz) erlaubte dabei eine Gegenkontrolle, ob gegebenenfalls Hyphen mit bereits erloschener GFP-Fluoreszenz übersehen wurden. Dabei zeigte sich, dass PMNs *A. fumigatus* Hyphen durchschnittlich zu einem Anteil von 30-40% abtöten konnten. Eine entsprechende Balkengrafik zeigt Abbildung 14.

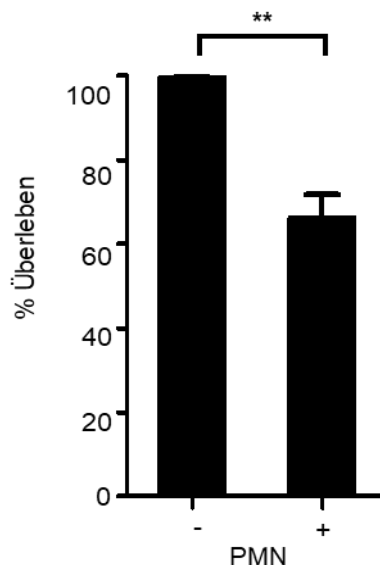


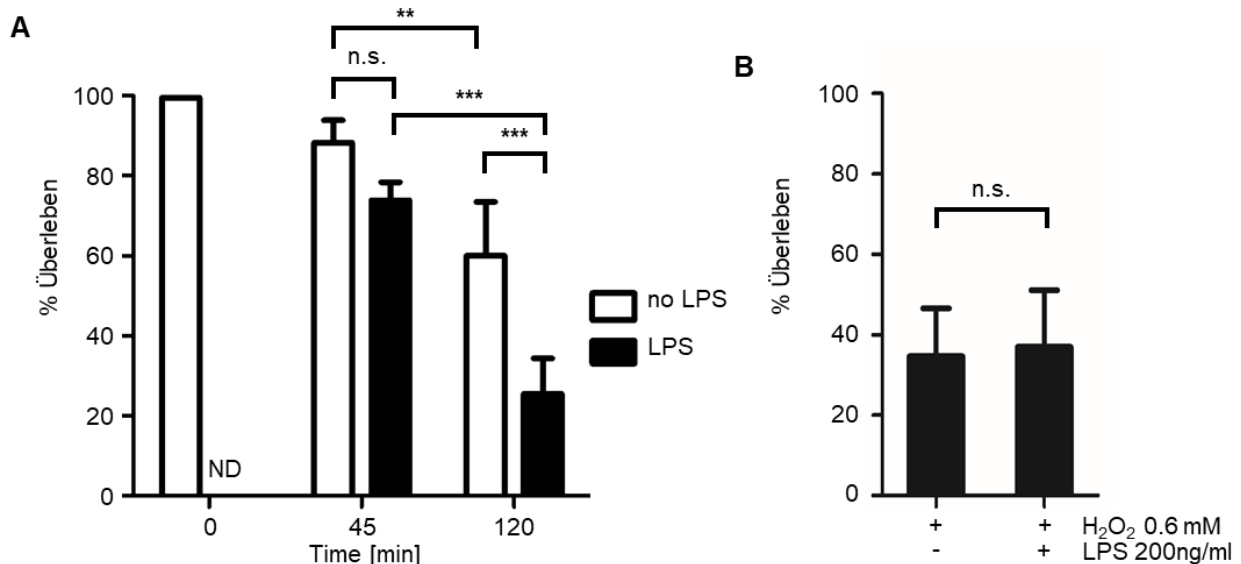
Abbildung 14: *A. fumigatus* Hyphen mit Expression eines mitochondrialen GFPs wurden nach 10-stündiger Vorinkubation bei 37°C 2h gegenüber PMNs exponiert. Nach Fixierung und Färbung mittels CFW wurden die Proben mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden Hyphen als vital definiert, die in >60% des Hyphenkörpers tubuläre oder lediglich teilweise fragmentierte Mitochondrien aufwiesen. Hier gezeigt ist exemplarisch ein Experiment mit drei technischen Replikaten. Gezählt wurden 180 Hyphen pro Well. Statistische Signifikanztestung erfolgte mittels Student's t-test. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

### 7.1.5 Lipopolysaccharide verstärken Granulozyten-induzierten Zelltod

In den nun folgenden zwei Kapiteln sollte die Eignung des neu entwickelten Assays für die Quantifizierung PMN-induzierten Hyphentods weiter geprüft und validiert werden, indem Granulozyten auf verschiedene Art und Weise stimuliert und deren Aktivitäts- und Abtötungsrate damit erhöht wurden. Die Fragestellung war hierbei, ob diese erhöhte Aktivitäts- und Abtötungsrate zuverlässig erkannt und quantifiziert werden kann. Ein allgemein anerkanntes extrinsisches Stimulanz ist das Lipopolysaccharid

(LPS) von gramnegativen Bakterien<sup>179–182</sup>. Hierfür wurde ultra-reines LPS aus dem *E.Coli* Stamm K12 ausgewählt (siehe Material und Methoden).

Unter Einfluss von LPS in einer finalen Konzentration von 200ng/ml war ein signifikant erhöhter Anteil getöteter Hyphen festzustellen. Wie in Abbildung 15 A gezeigt, wurden *A. fumigatus* Hyphen nun zu durchschnittlich 60-70% abgetötet (im Vergleich zu 30-40% ohne LPS, analog zu Abbildung 14). Es zeigten sich dabei gleiche mitochondrialen Morphologieänderungen wie unter Einfluss von PMNs ohne LPS bzw. unter Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jedoch mit leicht verschobenem Verhältnis: Es wurden häufiger Hyphen mit bereits erloschener Fluoreszenz beobachtet, Hyphen mit noch erhaltener tubulärer Struktur hingegen wurden zur Seltenheit (siehe hierzu auch Abbildung 12). Vermutlich ist dies auf die höhere fungizide Aktivität der Granulozyten zurückzuführen.



**Abbildung 15:** LPS stimuliert PMNs beim Abtöten von *A. fumigatus* unabhängig von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *A. fumigatus* Sporen mit mitochondrialem GFP wurden in RPMI-1640 ausgesät. Nach 10h Inkubation bei 37°C erfolgte in **(A)** die Zugabe von PMNs, in **(B)** die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zeitgleich erfolgte sofern vorgesehen die Zugabe von LPS in der angegebenen Konzentration. Nach 45 **(A)** bzw. 120min **(A,B)** wurden die Proben fixiert und anschließend mit CFW gefärbt. Dabei wurden Hyphen als vital definiert, die in >60% des Hyphenkörpers tubuläre oder lediglich teilweise fragmentierte Mitochondrien aufwiesen. **(A)** repräsentiert fünf, **(B)** drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanztestung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison post-test **(A)** sowie mittels Student's t-test **(B)**. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). ND bedeutet „non determined“ (engl. für nicht bestimmt). Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.



Eine weitere Fragestellung war, inwiefern sich eine unterschiedliche gemeinsame Inkubationszeit von PMNs und Hyphen mit oder ohne LPS auf das Überleben von *A. fumigatus* auswirkt. Nach 45min zeigt sich ohne Einwirkung von LPS eine durchschnittliche Reduktion des Überlebens von etwa 10%, unter Zugabe von LPS lässt sich dieser Anteil auf durchschnittlich 20-25% erhöhen (eine statistische Signifikanz war hierbei jedoch nicht gegeben)(Abbildung 15 A). Dieses Ergebnis bestärkt die in 7.1.4 beschriebene Beobachtung, dass bei zu kurzer Konfrontationsdauer von PMNs gegenüber *A. fumigatus* die Einflüsse auf das Überleben der Hyphen sehr gering sind. Da für spätere Fragestellungen deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp-Überleben und Überleben von Mutantenstämmen nötig sind (etwa um sensiblere oder resistendere Stämme adäquat zu unterscheiden), stellte sich für den Versuchsaufbau wie erwähnt eine Konfrontationsdauer von zwei Stunden als ideal dar. Bei längerer Inkubation als zwei Stunden kommt der Effekt des „Überwachsens“ zum Tragen: Wenige, überlebende Hyphen reichen in einer Phase des exponentiellen Wachstums aus, die mikroskopische Auswertung mit nötiger Detektion kleiner, abgetöteter Hyphen schwer zu behindern.

LPS allein hatte keinen Einfluss auf das Hyphenwachstum bzw. deren mitochondriale Morphologie (nicht gezeigt). Weiterhin hat die Zugabe von LPS zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keinen Einfluss auf den Anteil getöteter Hyphen (Abbildung 15 B) weshalb anzunehmen ist, dass LPS unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine Toxizität aufweist und nicht als chemischer Verstärker von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkt, sondern als Ligand (v.a. für Toll-like Rezeptor 4<sup>181,182</sup>) PMNs aktiviert.

### **7.1.6 Humanes Serum verstärkt Granulozyten-induzierten Zelltod**

Zur weiteren Überprüfung der neuen Methode wurde als alternatives Zellstimulanz humanes Serum verwendet. Erst kürzlich konnte mittels metabolischer Methoden (MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-basiertes Assay<sup>2</sup>) gezeigt werden, dass humanes Serum die antifungale Aktivität von PMNs steigert<sup>69</sup>.

---

<sup>2</sup> Die MTT-Methode ist vom Grundprinzip der von uns angewandten Resazurin-Methode sehr ähnlich: Die chemische Reduktion von MTT als Äquivalent eines aktiven Stoffwechsels wird colorimetrisch erfasst und über Zeit aufgezeichnet (siehe auch 6.11)

Da Serum allein aufgrund diverser enthaltener Proteine wie Komplementsystem, Antikörpern und Enzymen ein antimikrobielles Potenzial aufweist, wurde zunächst der Effekt von Serum in einer finalen Konzentration von 10% (v/v) auf *A. fumigatus* Hyphen ohne Zugabe von PMNs überprüft. Wie in Abbildung 16 zu sehen, konnte hierbei kein Einfluss auf die mitochondriale Morphologie der Pilzhypen festgestellt werden, es zeigte sich somit keine Reduktion des fungalen Überlebens.

Unter Zugabe von PMNs mit Serum (10% v/v) zeigte sich eine deutliche Reduktion des Überlebens von *A. fumigatus* Hyphen im Vergleich zu PMNs ohne Serum auf einen prozentualen Anteil von 10-20% im Vergleich zu 60-70% (Abbildung 17 B). Zusätzlich führten wir Versuche mittels der metabolisch-colorimetrischen Resazurin-Methode durch<sup>3</sup>. In Übereinstimmung mit Gazendam et al. 2016<sup>69</sup> wurde dabei eine signifikant

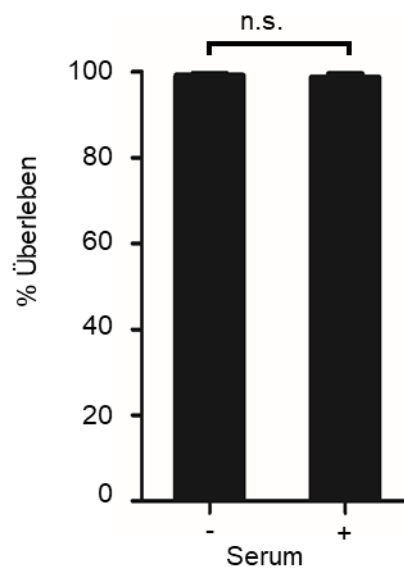


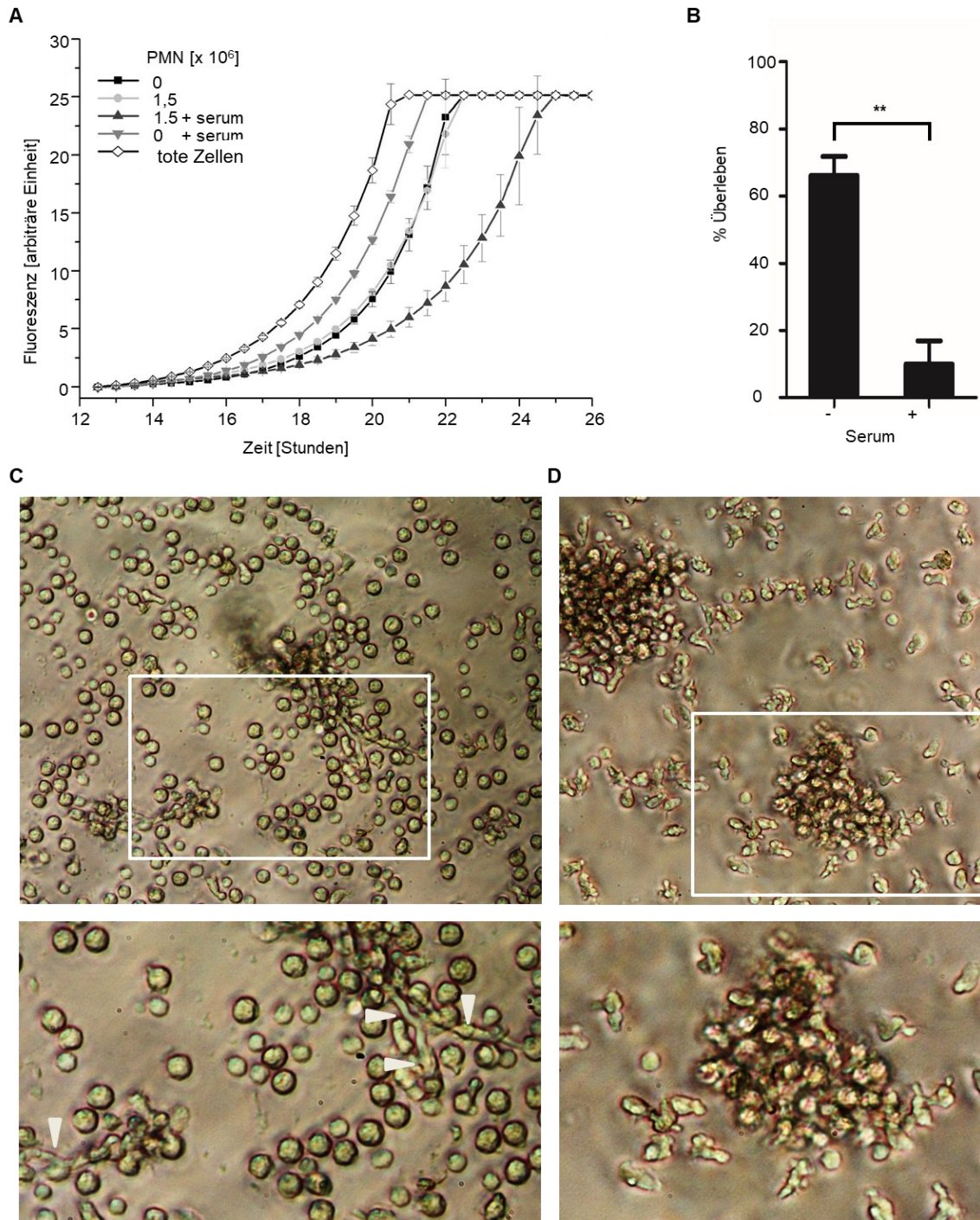
Abbildung 16: Einfluss von humanem Serum auf das Überleben von *A. fumigatus*. Mitochondriales GFP exprimierende *A. fumigatus* Sporen wurden in RPMI-1640 ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 9,5h erfolgte die Zugabe von humanem Serum in einer finalen Konzentration von 10% (v/v). Nach zweieinhalbstündiger weiterer Inkubation wurden die Proben fixiert und mit CFW gefärbt. In der anschließenden mikroskopischen Auswertung wurden Hyphen als vital definiert, die in >60% des Hyphenkörpers tubuläre oder lediglich teilweise fragmentierte Mitochondrien aufwiesen. Die statistische Auswertung ( $**p < 0,01$ ) erfolgte mittels Student's t-test. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Für die Gewinnung dieser Daten wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

<sup>3</sup> Die metabolisch-colorimetrischen Versuche mittels der Resazurin-Methode wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Victor Brantl (Arzt, Medizindoktorand) durchgeführt

niedrigere metabolische Aktivität (als Äquivalent für eine höhere Abtötungsrate) von *A. fumigatus* Hyphen bei Zugabe von PMNs mit Serum im Vergleich zu PMNs ohne Serum gemessen (Abbildung 17 A). Überraschenderweise erzeugte die Zugabe von PMNs ohne Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 17 A Kurve „0“) keinen signifikanten Unterschied in der Wachstumskurve. Ein interessantes zusätzliches Ergebnis ist dabei, dass die Zugabe von durch Eiswasser lysierten humanen Zellen zur Pilz-Kontrollgruppe (also zu denjenigen Proben, in denen zuvor keine Granulozyten zugegeben wurden) die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen deutlich erhöhte (Abbildung 17 A Kurve „tote Zellen“). Wie zu sehen, war dieser Effekt in schwächerem Umfang auch bei alleiniger Zugabe von Serum zu beobachten (Abbildung 17 A Kurve „0 + Serum“). Näheres hierzu siehe Diskussion (8.1). Die für Abbildung 17 A notwendigen Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Victor Brantl (Arzt, Medizindoktorand) durchgeführt.

Lichtmikroskopisch zu sehen waren deutliche morphologische Veränderungen der Granulozyten unter Zugabe von Serum. Sie zeigen deutlich ausgeprägtere amöbenhafte Entrundungen ihres Zellkörpers mit (Abbildung 17 D) im Vergleich zu ohne Serum (Abbildung 17 C). Weiterhin sichtbar war eine deutlich ausgeprägtere Anlagerung an *A. fumigatus* unter Einfluss von Serum: Die Pilzhypen waren meist nur indirekt durch die ausgeprägte Bildung von Zellhaufen zu erkennen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Zugabe von humanem Serum nicht nur zu einer beeindruckenden Steigerung der Abtötungsrate von *A. fumigatus*-Hyphen führt, sondern dass diese auf eine höhere humane Zellaktivität und nicht maßgeblich auf direkte fungizide/inhibitorische Effekte des Serums zurückzuführen sind.



**Abbildung 17:** Serum stimuliert die fungizide Aktivität von neutrophilen Granulozyten. *A. fumigatus* Sporen ohne **(A)** bzw. mit **(B-D)** mitochondrialem GFP wurden in RPMI-1640 ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 9,5h erfolgte die Zugabe von humanem Serum in einer finalen Konzentration von 10% (v/v) bzw. die Zugabe eines gleichen Volumens an Medium. Nach 10h erfolgte die Zugabe von PMNs für zwei Stunden. In **(A)** erfolgte anschließend eine Lyse der humanen Zellen mit doppelt destilliertem Eiswasser. Nach 30-minütiger Einwirkzeit erfolgte dann die Zugabe von *Aspergillus* Minimalmedium und Resazurin. Kontrollen wurden in gleicher Weise behandelt mit Ausnahme einer Gruppe („tote Zellen“ in **(A)**), bei der vorheriger Überstand lysierter PMNs in das Medium gemischt wurden. (Fortsetzung auf nächster Seite)

(Fortsetzung von Abbildung 17): Anschließend wurde die Reduktion von Resazurin in Resofurin bei 37°C maschinell aufgezeichnet und im gezeigten Graph dargestellt. Zahlen in der Legende (0 bzw. 1,5) beziehen sich auf die Anzahl zugegebener PMNs x 10<sup>6</sup>. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. **(B)** und **(C)** zeigen lichtmikroskopische Übersichtsbilder nach Ablauf der zweistündigen killing time ohne **(B)** bzw. mit **(C)** Zugabe von humanem Serum. Gut zu sehen und durch weiße Pfeile markiert sind in **(B)** Hyphenabschnitte, die an dieser Stelle weniger dicht von PMNs besetzt sind und damit mit bloßem Auge sichtbar sind. Dies ist in **(C)** durch den höheren Zellbesatz durch Zellstimulation nicht möglich, die Position von Hyphen ist jedoch indirekt durch die auffällige Haufenbildung der Granulozyten zu erkennen. Die weißen Rechtecke markieren die in der unteren Zeile dargestellten Vergrößerungen. Für eine Ermittlung des prozentualen Überlebens der *A. fumigatus*-Hyphen wurden die Proben in **(D)** nach Ablauf von 120min fixiert und mit CFW gefärbt. Eine Hyphe wurde dann als vital gewertet, wenn mehr als 60% des Hyphenkörpers tubuläre oder lediglich leichtgradig fragmentierte Mitochondrien aufwies. Für Details darf auf den Abschnitt Material und Methoden verwiesen werden. Statistische Signifikanzberechnung (\*\*p<0,01) erfolgte mittels Student's t-test. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

### 7.1.7 Antimykotika haben Auswirkung auf die mitochondriale

#### Morphologie

Zur weiteren Validierung des neuen Assays wurde die Wirkung von Antimykotika auf die mitochondriale Morphologie untersucht. Dieser Ansatz wurde – insbesondere für die Antimykotika-Klasse der Azole - auch von anderen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für andere Projekte verwendet<sup>183</sup>.

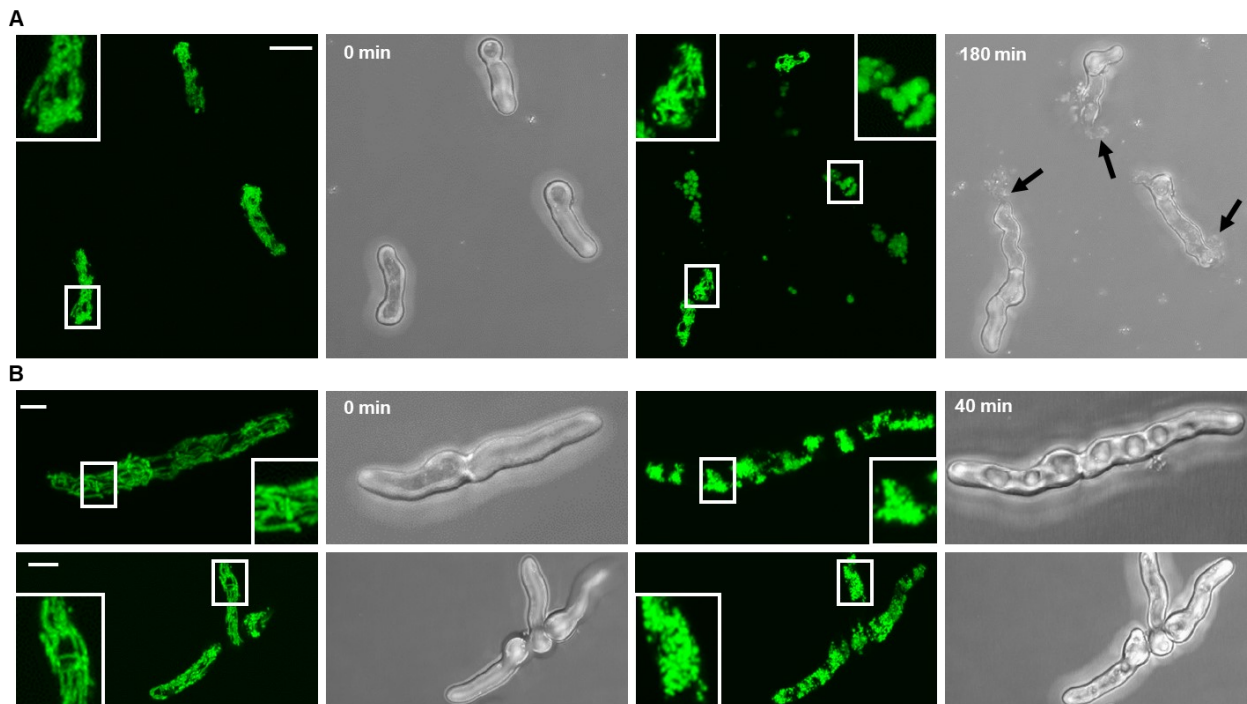
Für ein orientierendes Experiment wurden *A. fumigatus* Sporen mit mitochondrialem GFP in *Aspergillus* Minimal Medium (AMM) ausgesät und bei 37°C für 10h inkubiert, um ein frühes Hyphenstadium zu erreichen. Dann erfolgte die Zugabe von Antimykotika und das Anfertigen fluoreszenzmikroskopischer Schichtaufnahmen wie in Abbildung 18 gezeigt.

Caspofungin als Vertreter der Klasse der Echinocandine ist ein Zellwandsynthesehemmer. Zu beobachten war eine weithin erhaltene tubuläre Mitochondrienmorphologie bis es zunehmend zu einem Aufplatzen einzelner Kompartimente der Hyphen kommt, gut erkennbar an extrazellulärem Material in Licht- und Fluoreszenzmikroskopie sowie der bis auf wenige, sphärische Mitochondrien erloschenen GFP-Fluoreszenz innerhalb der jeweiligen Kompartimente (Abbildung 18



A, siehe Pfeile für aufgeplatzte Kompartimente). Interessanterweise zeigten die übrigen, nicht aufgeplatzten Hyphenkompartimente weiterhin unverändert eine tubuläre mitochondriale Struktur: Dieses Phänomen erklärt, weshalb Echinocandine auf *A. fumigatus* lediglich fungistatische Wirkung zeigen<sup>184</sup>, da nicht-geplatzte Hyphenkompartimente – wenn auch verlangsamt – weiterwachsen können.

Amphotericin B beeinflusst die Integrität der Zellmembranen (siehe 5.3.). Zu beobachten ist nach einer kurzen Latenzzeit eine ausgeprägte mitochondriale Fragmentierung mit mitochondrialem Clustering nahezu aller *A. fumigatus* Hyphen (Abbildung 18 B).



**Abbildung 18:** Erfolgreiche Anwendung von mitoFLARE bei der Einwirkung von Caspofungin und Amphotericin B auf *A. fumigatus*. Beide Substanzen führen zu erheblichen Disruptionen des mitochondrialen Netzwerks, wobei Caspofungin als Zellwandsynthesehemmer typischerweise zu einem Aufplatzen der Hyphen mit konsekutiv extrazellulärer mitochondrialer Fluoreszenz und intrazellulärem Material (Pfeile) führt. Für dieses Experiment wurden *A. fumigatus* Sporen mit mitochondrialem GFP in AMM ausgesät. In **(A)** erfolgte nach zehnstündiger Vorinkubation bei 37°C die Zugabe von 4 µg Caspofungin, in **(B)** von 2 µg Amphotericin B. In regelmäßigen Abständen erfolgte anschließend die Anfertigung mikroskopischer Schichtaufnahmen mittels einem Konfokallasermikroskops. Gezeigt sind GFP-Fluoreszenzbilder sowie Lichtmikroskopische Aufnahmen nach 0,40 sowie 180min. Der Eichbalken repräsentiert 5 µm. Die Abbildung wurde aus eigener Publikation modifiziert übernommen<sup>178</sup>.

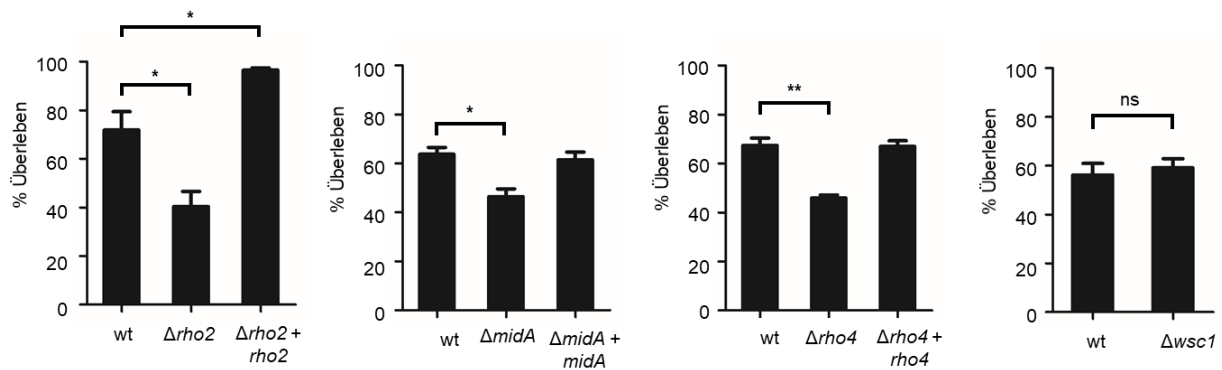
## **7.2 Die Zellwandstress-Mutanten $\Delta\rho2$ , $\Delta midA$ sowie die Deletionsmutante $\Delta\rho4$ zeigen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Granulozyten**

Die neue Methode zur Lebend-/Totdifferenzierung mittels mitochondrialer Morphologie wurde durch die Experimente in 7.1.1 bis 7.1.7 etabliert und validiert. Nun sollten Stämme auf ihr Überleben in Gegenwart von neutrophilen Granulozyten überprüft werden, bei denen Gene deletiert wurden, die für dem Zellwandintegritätsweg zugeordnete Proteine kodieren (siehe auch 5.5). Als Kontrollen wurden Komplementanten mitgeführt, also Deletionsmutanten die durch erneutes Einbringen des deletierten Gens mit einem über homologe Rekombination integrierenden zirkulären Vektor komplementiert wurden.

Für diese Experimente wurden dabei analog zu den Versuchen in 7.1.4, 7.1.5 und 7.1.6 nach einer Vorinkubation von 10h in RPMI-1640 *A. fumigatus*-Hyphen mit mitochondrialem GFP neutrophilen Granulozyten für 2h ausgesetzt und danach das prozentuale Überleben mikroskopisch anhand der mitochondrialen Morphologie bestimmt.

Untersucht wurden die Deletionsmutanten  $\Delta\rho2$ ,  $\Delta midA$ ,  $\Delta wsc1$  und  $\Delta\rho4$  mit den jeweiligen Komplementanten als Kontrolle. Alle Deletionsmutanten weisen dabei im frühen Hyphenstadium ein vom Wildtyp nicht zu unterscheidendes Wachstum sowie bis auf  $\Delta\rho4$  eine normale Morphologie auf.  $\Delta\rho4$  zeichnet sich durch ein beinahe vollständiges Fehlen von Septen aus.

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.  $\Delta\rho2$  weist eine signifikant reduzierte Überlebensrate von durchschnittlich 40% im Vergleich zu 70% beim Wildtyp auf. Bei  $\Delta\rho4$  und  $\Delta midA$  fallen die Unterschiede mit 50% im Vergleich zu 70% leicht geringer aus, sind jedoch ebenfalls signifikant. Für  $\Delta wsc1$  konnte kein verändertes Überleben im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.



**Abbildung 19:** Die Zellwandintegritätsmutanten  $\Delta\rho2$  und  $\Delta midA$  sowie die Deletionsmutante  $\Delta\rho4$  jedoch nicht die Zellwandintegritätsmutante  $\Delta wsc1$  zeigen eine höhere Sensibilität gegenüber PMN-vermittelter antifungaler Aktivität. *A. fumigatus* Sporen mit mitochondrialem GFP wurden in RPMI-1640 ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 10h erfolgte die Zugabe von PMNs mit folgender gemeinsamer Inkubation für 2h. Anschließend wurden die Proben fixiert und mit CFW gefärbt. Die Auswertung erfolgte fluorezenzmikroskopisch. Als vital gewertet wurden dabei Hyphen, die zu mindestens 60% ihres Hyphenkörpers tubuläre oder lediglich teilweise fragmentierte Mitochondrien aufweisen. Statistische Signifikanzberechnung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison post-test ( $\Delta\rho2$ ,  $\Delta midA$ ,  $\Delta\rho4$ ) sowie mittels Student's t-test ( $\Delta wsc1$ ). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Alle abgebildeten Graphen basieren auf drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Unerwarteterweise zeigte sich, dass die Komplementante  $\Delta\rho2 + \rho2$  reproduzierbar mit einer Überlebensrate von durchschnittlich 95% eine signifikant gesteigerte Resistenz gegenüber PMNs aufweist (erste Balkengrafik von links in Abbildung 19).

### 7.3 Verhalten der Komplementationsmutante $\Delta\rho2 + \rho2$ gegenüber Zellwandstress im Tüpfeltest und genetische Ursachensuche

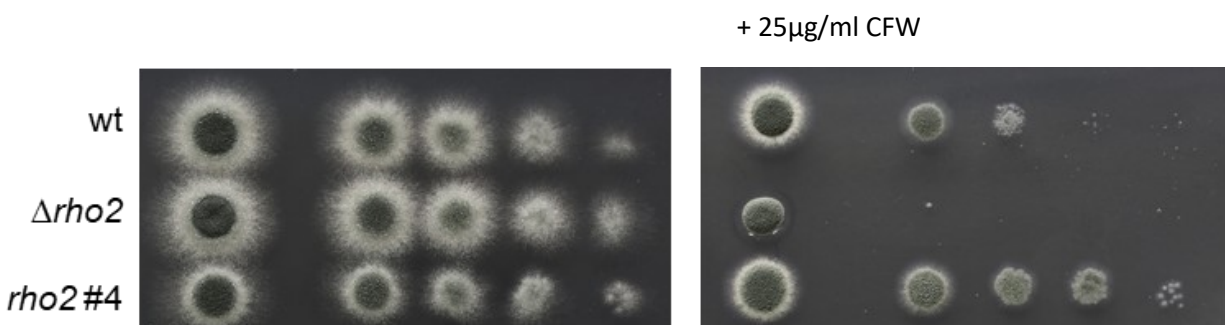
#### 7.3.1 $\Delta\rho2 + \rho2$ zeigt eine erhöhte Zellwandstressresistenz im Tüpfeltest

In 7.2 konnte mithilfe von mitoFLARE gezeigt werden, dass die Komplementante  $\Delta\rho2 + \rho2$  eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten aufweist. Da die Rho-GTPase Rho2 dem Zellwandintegritätsweg zugeordnet wird<sup>12,83</sup>, ergab sich die Vermutung, dass  $\Delta\rho2 + \rho2$  eine erhöhte Zellwandstressresistenz aufweist, die auch eine erhöhte Resistenz gegenüber PMNs erklären könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, führten wir Tüpfeltests mit CFW als etablierten Zellwandstressor<sup>11,12</sup> durch.



Dabei wurden Verdünnungsreihen der Stämme Wildtyp,  $\Delta rho2$  sowie  $\Delta rho2+rho2$  (in Abbildungen aus Platzgründen kurz als *rho2* bezeichnet) auf vorgegossenen Agarplatten mit und ohne Beimischung von CFW (25µg/ml) angelegt. Hierbei zeigte sich die bereits vorbeschriebene stark erhöhte Empfindlichkeit von  $\Delta rho2$ <sup>12</sup>, zudem eine erhöhte Resistenz von  $\Delta rho2+rho2$  gegenüber CFW.

Es ist denkbar, dass bei der Herstellung von Komplementanten (siehe Material und Methoden) Komplementationsvektoren mehrfach ins Genom des Pilzes integrieren. Eine mehrfache Integration könnte im Vergleich zum Wildtyp zu einer gesteigerten



**Abbildung 20:** Die Komplementante *rho2* zeigt erhöhte Zellwandstressresistenz im Tüpfeltest. Agarplatten mit AMM wurden vorbereitet, in die hier rechts dargestellte Platte wurde Calfoclorweiß in einer finalen Konzentration von 25µg/ml beigefügt. *A. fumigatus*-Sporen der angegebenen Stämme wurden in einer von links nach rechts absteigenden 1:10 Verdünnungsreihe in einem Volumen von 3µl aufgetropft und anschließend bei 37° C für 34h inkubiert. Anschließend wurden die Platten fotografiert.

Expressionsrate des entsprechenden Gens. Folglich ergab sich als eine mögliche Erklärung die Hypothese, dass bei  $\Delta rho2+rho2$  durch mehrfache Integration des Konstruktes es zu einer Überexpression von *rho2* und zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Zellwandstress kommt.

Eine weitere Beobachtung ist die in Abbildung 20 zu erkennende leicht reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit der Komplementationsmutante *rho2*#4: Alle Tüpfel wirken ohne Einfluss von CFW kleiner insbesondere im weißen Randbereich der Kolonien. Dieses Ergebnis war reproduzierbar und nicht etwa durch eine versehentliche geringere Sporenkonzentration zu erklären und wird in 7.6 genauer beleuchtet.

### 7.3.2 Erstellung neuer $\Delta rho2 + rho2$ Komplementanten

Bei ausreichend großer Anzahl an Klonen nach einer Transformation sollten in der Theorie neben Klonen mit mehrfach integrierten Vektoren auch solche mit Einzelintegration vorliegen. Deshalb wurde die Deletionsmutante  $\Delta rho2\#7$  mit dem bereits vorhandenen und für die bisher verwendeten Komplementationsmutanten bereits eingesetzten Komplementationsvektor pJW649<sup>12</sup> (siehe Abbildung 21 A) erneut transformiert. Im Folgenden getestet wurden neben den bisher vorhandenen Klonen #1-4 die so neu erstellten Klone #5-10. Die Richtigkeit der Klone wurde durch die in 7.3.3 beschriebene PCR-Integrationsanalyse überprüft.

### 7.3.3 Mit dem Vektor pJW649 transformierte Komplementanten-Klone ( $\Delta rho2 + rho2$ ) weisen unterschiedlich häufige Integrationen auf

Um die Hypothese der Mehrfachintegration zu prüfen, wurden mittels PCR die Häufigkeit der Integrationen überprüft.

Die Integration des Vektors pJW649 in  $\Delta rho2$ , ein Derivat des Stamms AfS35 - ein Wildtypstamm, dem die Fähigkeit für non-homologes End-joining durch Deletion von *akuA* fehlt<sup>174</sup> - erfolgt praktisch ausschließlich über homologe Rekombination. Dabei sind im Vektor pJW649 zwei Bereiche enthalten, über die eine homologe Rekombination stattfinden kann: Der eine Bereich ist die Promoter-Region 5'-wärts vom Gen *rho2*, der andere Bereich ist der im Vektor enthaltene terminierende Bereich *his2A(t)*. Somit ist eine Integration am „Wildtyplocus“ über den Promoterbereich sowie eine Integration am „*his2A*-locus“ über *his2A(t)* möglich. An beiden loci kann es nun zu einer einzelnen Integration des Vektors (Abbildung 21B I und III) sowie zu einer mehrfachen Integration (Abbildung 21 B II und IV) kommen. In Abbildung 21 dargestellt sind die vier zur Analyse verwendeten PCRs sowie die PCR-Produkte des Klons #4, der – sofern nicht anders gekennzeichnet – für alle Experimente als Referenzklon für  $\Delta rho2 + rho2$  diente. Zu erkennen ist im Teil B der Abbildung, dass das Vorhandensein eines PCR-Produkts der PCRs 1-4 allein keine sichere Aussage bzgl. Integrationsort und – anzahl zulässt, sondern nur die Kombination aller vier PCRs. Zudem kann es dazu kommen, dass keine klare Aussage bzgl. Integrationsort- und anzahl möglich ist: Bei positiver PCR 1, 2, 3 und 4 kann keine Unterscheidung getroffen werden zwischen mehrfacher Integration am *his2A*-locus und mehrfacher Integration am Wildtyplocus

und jeweils einzelner Integration am *his2A*-locus und einzelner Integration am Wildtyplocus. Dieses Problem ist insofern jedoch von untergeordneter Wichtigkeit, da eine Integration an beiden Orten – selbst wenn sie dort jeweils einzeln stattgefunden hat – insgesamt einer Mehrfachintegration entspricht. Weiterhin nicht möglich war eine Unterscheidung zwischen zweifacher und noch höherzahliger Integration an einem der *loci*. Es war lediglich die Unterscheidung „einfach“ oder „mehrfach“ möglich. Zur Überprüfung der Hypothese war es jedoch ausreichend, Komplementationsmutanten mit sicherer Einzelintegration (also 1. Integration nur an einem der *loci* und 2. dort lediglich eine einzelne Integration) mit solchen mit sicherer mehrfacher Integration, (also entweder Einzelintegration an beiden Orten oder mehrfache Integration an einem oder an beiden Orten) zu vergleichen, wofür die dargestellten PCR-Testungen ausreichend waren.

Die Ergebnisse sowie die Auswertung der durchgeführten PCRs aller Klone #1-#10 wurden in einer gemeinsamen Tabelle zusammengefasst (Abbildung 22). Es ergibt sich eine sichere Einzelintegration der Klonen #2 (am Wildtyp-locus) sowie #9 (am *his2A*-locus). In den Klonen #1, #3 - 8 sowie #10 kam es zu einer mehrfachen Integration (wobei für Klon #1 und #6 aufgrund einer Integration am Wildtyplocus und am *his2A*-locus keine weitere Aussage möglich war). Klon #3 lieferte inkonsistente PCR-Produkte und wurde deshalb nicht in die weitere Auswertung miteingeschlossen. In Abbildung 21 mit einem Sternchen markiert sind unspezifische PCR-Produkte der als Kontrollen mitgeführten Stämme Wildtyp und  $\Delta\rho2$ .

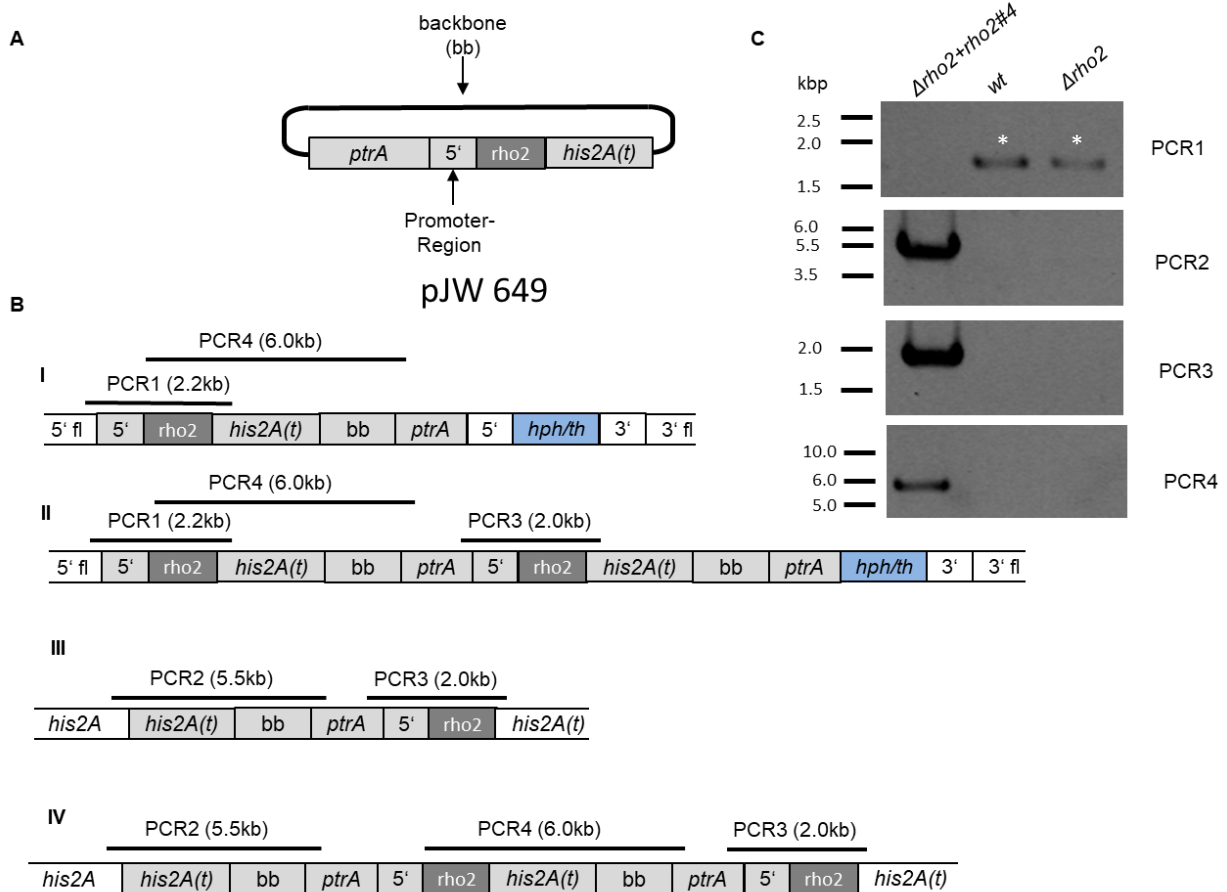


Abbildung 21: Übersichtsbild zur pJW649-Integrationsanalyse der  $\Delta\rho2 + \rho2$  Komplementationsmutanten. **(A)** zeigt den zur Komplementation verwendeten Vektor pJW649 mit endogenem Promoter (5'). Eine Integration über homologe Rekombination in Afs35 ist am Wildtyplocus über den homologen Bereich 5'UTR (Promoter) oder am *his2A*-Genlocus über den *his2A* terminierenden Bereich (*his2A(t)*) möglich. In **(B)** abgebildet sind verschiedene Möglichkeiten der Integration: **I** zeigt eine einzelne Integration am Wildtyp-Genlocus, **II** eine mehrfache (hier: zweifache) Integration am Wildtyp-Genlocus, **III** eine einzelne Integration am *his2A*-Genlocus, **IV** eine mehrfache (hier: zweifache) Integration am *his2A*-Genlocus. Eingezeichnet sind die Amplifikationsbereiche der zur Testung von Richtigkeit der Komplementation, sowie zur Testung von Integrationsort und Integrationsanzahl verwendeten PCRs. **(C)** zeigt exemplarisch die PCR des Referenzklons  $\Delta\rho2 + \rho2\#4$ , welcher wie zu erkennen mehrfach am *his2A*-Genlocus integriert hat **(A und B)** und für alle Experimente als Referenzklon für  $\Delta\rho2 + \rho2$  diene. In Grau dargestellt ist der eingebrachte Vektor (dunkelgrau dargestellt ist das Gen *rho2*), weiß sind flankierende Bereiche des Pilzgenoms. Blau dargestellt ist der Hygromycin-Resistenzbereich der Deletionskassette von  $\Delta\rho2$ .

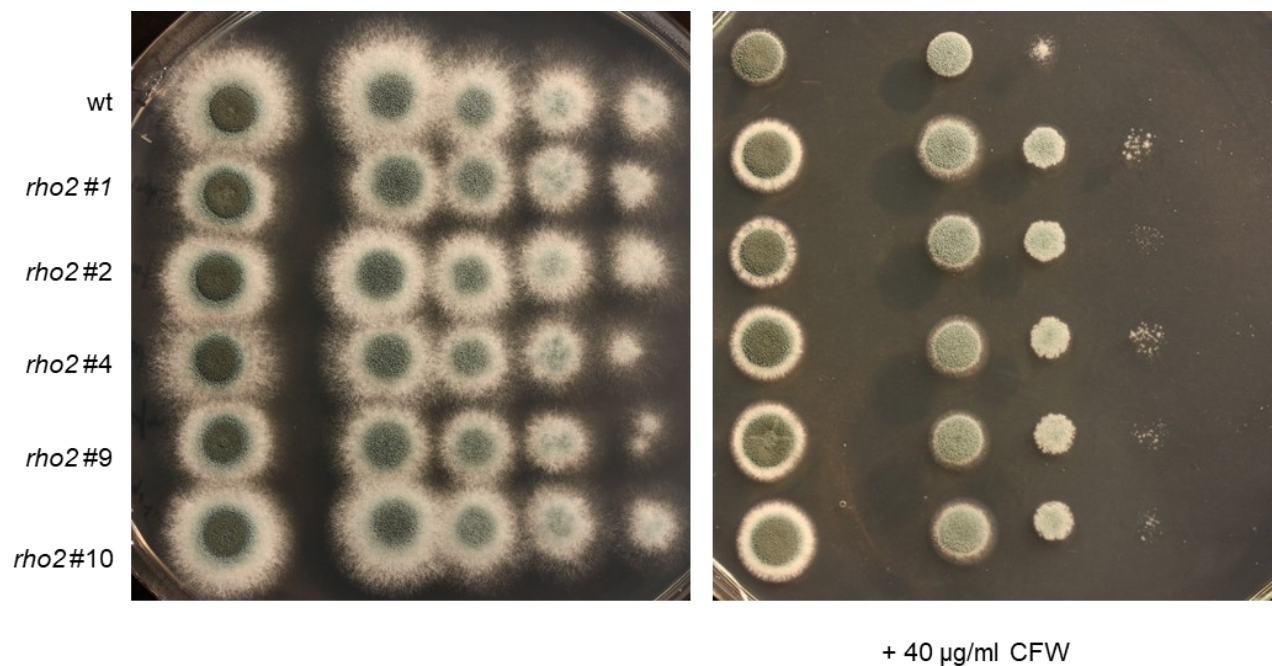
Die Ergebnisse der dargestellten PCR-Analysen zeigen, dass überraschenderweise eine Mehrfachintegration des Plasmidkonstrukts in *A. fumigatus* mehr die Regel als die Ausnahme ist – eine Überexpression von *rho2* in den meisten der transformierten Klone ist also anzunehmen.

Klon #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PCR 1	+	+	?	-	+	+	+	-	-	-
PCR 2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
PCR 3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR 4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Wt-locus?	ja	ja	?	nein	ja	ja	ja	nein	nein	nein
His2A-locus?	ja	nein	ja	ja	nein	ja	nein	ja	ja	ja
Einfach wt-locus?	?	ja	?	nein	nein	?	nein	nein	nein	nein
Einfach his2A-locus?	?	nein	ja	nein	nein	?	nein	nein	ja	nein
Mehrfach wt-locus?	?	nein	?	nein	ja	?	ja	nein	nein	nein
Mehrfach his2A-locus?	?	nein	nein	ja	nein	?	nein	ja	nein	ja

**Abbildung 22:** Übersichtstabelle über die getesteten Klone  $\Delta\rho2 + \rho2$  #1-10. Die PCRs 1-4 beziehen sich auf die dargestellten PCRs in Abbildung 21. Grün markiert sind die Klone, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine einzelne Integration aufweisen: Klon 2 (wt-locus) und 9 (*his2A*-locus). Klon 1 und 6 weisen eine Integration an beiden loci auf, wodurch eine Aussage bezüglich einer mehrfachen Integration an den jeweiligen loci unmöglich ist. Klon 3 lieferte bei PCR 1 inkonsistente Ergebnisse (schwaches Produkt, manchmal kein Produkt). Blau markiert ist der Referenzklon  $\Delta\rho2 + \rho2$  #4, welcher – sofern nicht anders gekennzeichnet – für alle Experimente verwendet wurde.

### 7.3.4 Einzelne integrierte Klone pJW649 zeigen weiterhin erhöhte Zellwandstressresistenz

Nachdem nun mit hoher Wahrscheinlichkeit einzelne integrierte Klone (#2 und #9) identifiziert wurden, sollte im Folgenden überprüft werden, ob diese einzelne Integration mit mutmaßlich wildtypähnlicher Expression von *rho2* mit einer normalen Sensibilität gegenüber CFW auf Wildtypniveau korreliert. Zu diesem Zweck wurde erneut ein sogenannter Tüpfeltest analog zu 7.3.1 durchgeführt.



**Abbildung 23:** Klone der Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  mit einzelner Integration des Vektors pJW649 in  $\Delta\rho2$  zeigen eine unverändert erhöhte Resistenz gegenüber CFW. Agarplatten mit Aspergillus Minimalmedium (AMM) wurden vorbereitet, in die hier rechts dargestellte Platte wurde Calfochlorweiß in einer finalen Konzentration von 40µg/ml beigefügt. *A. fumigatus* Sporen der angegeben Stämme wurden in einer von links nach rechts absteigenden Verdünnungsreihe in einem Volumen von 3µl aufgetropft und anschließend bei 37° C für 38h inkubiert. Anschließend wurden die Platten fotografiert.

Dabei zeigte sich, dass die einzeln integrierten Klone #2 und #9 keinen signifikanten Wachstumsunterschied zu den anderen untersuchten Klonen #1, #4 (Referenzklon) und #10 aufweisen – es besteht eine deutlich zu erkennende erhöhte Resistenz gegenüber CFW<sup>4</sup> im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 23). Dies scheint der Hypothese zu widersprechen, die erhöhte Resistenz der Komplementanten beruhe auf einer erhöhten *rho2*-Expressionsrate.

## 7.4 Erstellung der Komplementante $\Delta\rho2+\rho2_{add3'}$ und ihr Verhalten im Tüpfeltest

### 7.4.1 RNA-Sequenzierdaten für *rho2* zeigen starke Transkription der 3'-UTR

Um der Frage nachzugehen, weshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit einzeln integrierte Vektoren in  $\Delta\rho2$  weiterhin eine erhöhte Resistenz gegenüber CFW aufweisen wurden öffentlich verfügbare Daten aus RNA-Sequenzierungen gesichtet. Abzurufen sind diese unter [fungidb.org](http://fungidb.org) der Arbeitsgruppe EUPathDB Project Team. Die Daten für *A. fumigatus* und des betreffenden Gens *rho2* stammen von einem breit angelegten Sequenzierprojekt von 2014<sup>185</sup>.

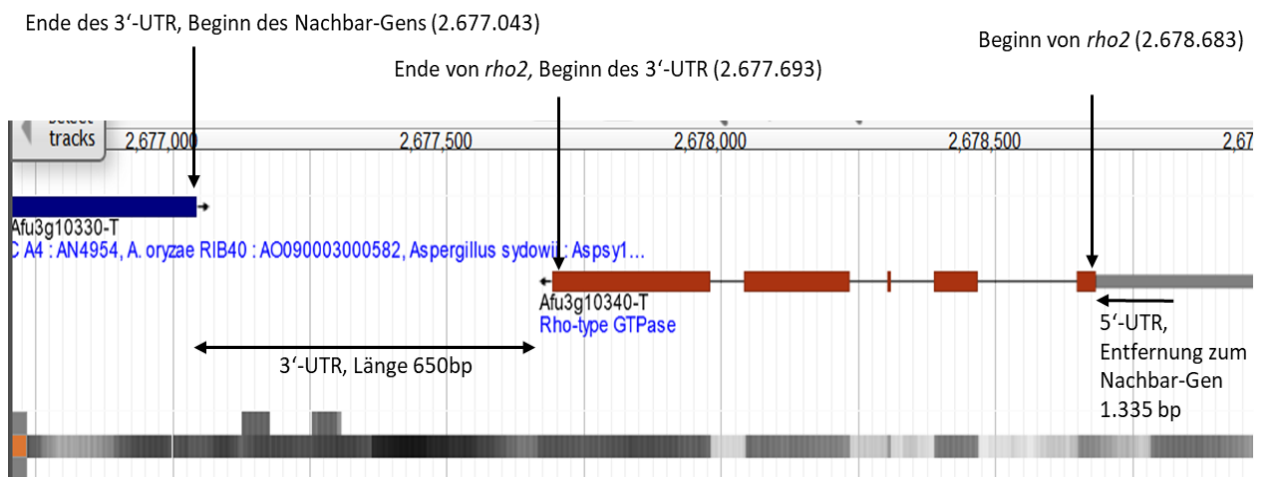
Abbildung 24 zeigt einen modifizierten Screenshot aus dem Browsertool JBrowse, welcher neben einem chromosomalen Ausschnitt (Chromosom 3, Region von *rho2* = Afu3g10340) auch RNA-Sequenzierdaten inkludiert – dargestellt durch den grauen Balken unter dem in rot markierten Genbereich<sup>186</sup>. Dabei bedeuten dunkelgrau bis schwarze Bereiche eine sehr hohe Transkriptionsrate, hellgraue und weiße Bereiche eine niedrigere Transkriptionsrate. Zu erkennen ist eine auffällig hohe Transkriptionsrate der 3'-UTR (engl. für untranslated region) von *rho2*. Über die

---

<sup>4</sup> Anzumerken ist an dieser Stelle, dass für dieses Experiment mit 40µg/ml eine nominell höhere Konzentration von CFW verwendet wurde als in den anderen in dieser Arbeit gezeigten Tüpfeltests. Dies liegt an dem im arbeitsgruppenintern bereits bekanntem Phänomen, dass die Wirkungsintensität von CFW eine deutliche Chargenabhängigkeit aufweist – auch bei nominell gleicher Konzentration. Das für dieses Experiment verwendete CFW stammt aus einer anderen Charge als dasjenige für alle anderen gezeigten Tüpfeltests. Die Wirkungsintensität von 40µg/ml in diesem Experiment ähnelt dabei der von 25µg/ml in den anderen Experimenten. Die CFW-Konzentration wurde dabei solange titriert, bis optisch eine gleiche Wirkung der beiden Chargen im Tüpfeltest bestand.

Funktion der 3'-UTR von Genen in *A. fumigatus* gibt es wenig Erkenntnisse, denkbar ist eine regulatorische Funktion dieses Bereichs (siehe auch 8.3.3).

Im bisherigen Komplementationskonstrukt von  $\Delta\rho2 + \rho2$  ist die 3'-UTR nicht enthalten, die Transkription endet somit nach dem letzten Exon. Wir stellten die Hypothese auf, dass durch das Fehlen der 3'-UTR eine regulatorische Komponente fehlt, die zu einer erhöhten Expressionsrate von *rho2* führt. Würde die 3'-UTR wiederhergestellt, sollte sich folglich der Phänotyp der erhöhten Zellwandstressresistenz normalisieren. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine neue, durch die 3'-UTR erweiterte Komplementante namens  $\Delta\rho2 + \rho2_{\text{add}3'}$  erstellt.



**Abbildung 24:** Gezeigt ist ein Ausschnitt des Chromosoms 3 des sequenzierten *A. fumigatus* Stamms Af293. Zu sehen ist das Gen *rho2* (Afu3g10340) mit seinen 5 Exons (rote Kasten) und den dazwischenliegenden Introns. Blau links ist das am 3'-Bereich benachbarte Gen Afu3g10330. Unten in grau abgebildet sind Transkriptionsanalysen aus öffentlich verfügbaren RNA-Sequenzierdaten. Je dunkler das Grau (bis hin zu schwarz), desto stärker wurde eine Transkription des Bereichs festgestellt. In der Abbildung markiert ist der 3'-UTR von *rho2*, der eine auffällig hohe Transkriptionsrate aufweist. Die Daten stammen von der Internetseite fungidb.org, zur Abbildung wurde das Tool JBrowse verwendet<sup>186</sup>. Die Abbildung stellt einen modifizierten Screenshot dar.

#### 7.4.2 Erstellung des Komplementationsvektors pDR003

Folglich wurde ein neuer Komplementationsvektor kloniert, welcher nach dem letzten Exon von *rho2* auch die folgenden 1009bp der 3'-UTR enthält. Der bereits im alten Konstrukt pJW649 enthaltenem endogenen Promoterbereich (5'-UTR) wurde von 920bp auf 1126bp verlängert. Gemeinsam wies der zu integrierende homologe Bereich 5'-UTR-*rho2*-3'-UTR nun 3126bp auf. Nicht enthalten im Unterschied zu pJW649 ist



der als terminierender und zur homologen Rekombination dienende Bereich *his2A(t)*. Dies ermöglicht die Integration via homologer Rekombination nur am Ort der Deletionskassette (also dem Wildtyplocus), was die folgenden PCR-Analysen im Vergleich zu 7.3.3 deutlich vereinfacht<sup>5</sup>. Eine homologe Rekombination ist durch die Länge (3126bp) des homologen Bereichs im Konstrukt dennoch möglich und effektiv genug. Eine Überprüfung der Richtigkeit erfolgte inkludiert in die PCR-Analysen der Integrationszahl (siehe 7.4.3).

#### **7.4.3 Mit dem Vektor pDR003 transformierte Komplementanten-Klone**

##### **( $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$ ) weisen unterschiedlich häufige Integrationen auf**

Analog zu 7.3.3 wurde mittels einem System aufeinander abgestimmter PCRs eine Analyse der Integrationsanzahl der Transformationsklone #1 - #11 durchgeführt, da erneut zumindest in einigen Klonen eine mehrfache Integration des Vektors zu erwarten ist. Durch das Fehlen von *his2A(t)* ist im Gegensatz zur Testung in 7.3.3 eine Integration nur noch im Bereich der Deletionskassette (Wildtyp-locus) möglich. Durch die Erweiterung des 3'-Bereichs am 3'UTR ist jedoch neben dem 5'-UTR (endogener Promoterbereich) ein zweiter homologer Bereich zur Integration via homologer Rekombination am Wildtyp-Locus entstanden. Die PCR-Analyse musste also zwei Qualitäten prüfen: Zunächst die Integration am 5' oder am 3' homologen Bereich und anschließend – sofern nur an einem der Orte eine Integration erfolgt ist – eine Überprüfung auf Mehrfachintegration am jeweiligen Ort.

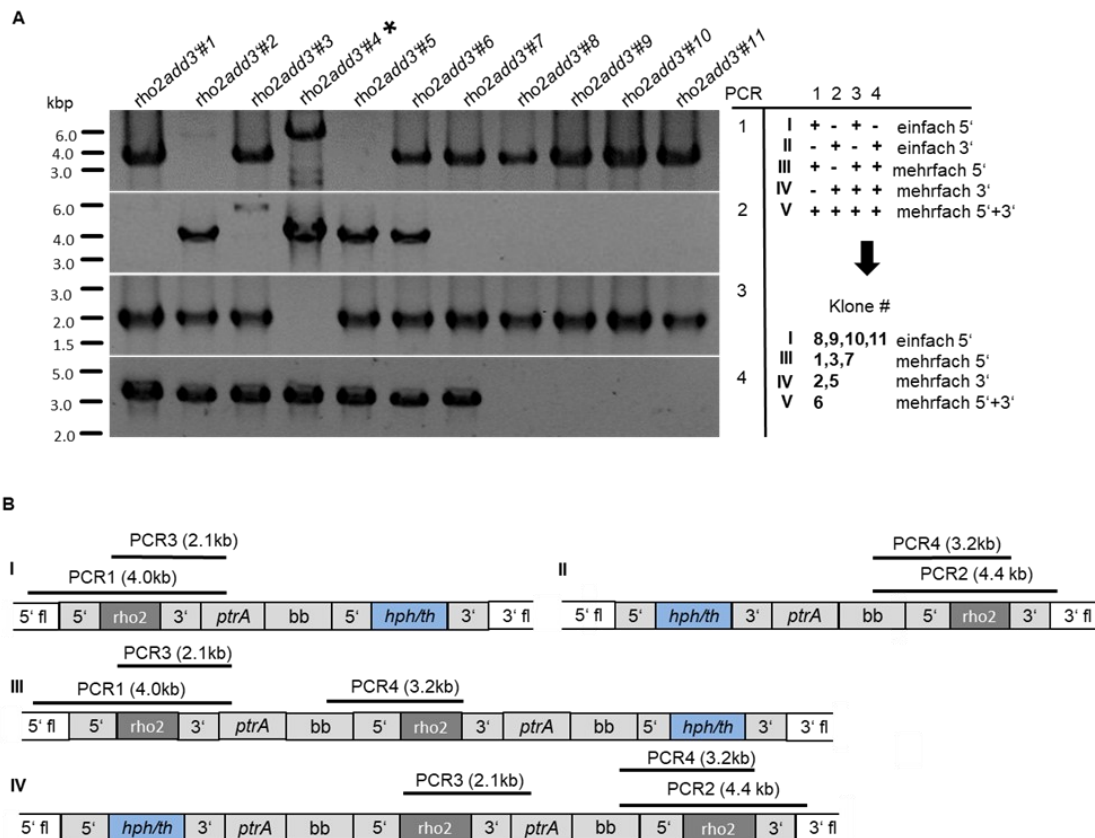
Eine Integration am 5'-Bereich resultiert in einer Wiederherstellung der gesamten 5'-UTR, der endogene Promoterbereich (der im Vektor nur mit 1126bp vor dem ATG enthalten ist) wird somit um strangaufwärts liegende Teile erweitert. Eine Integration am 3'-Bereich resultiert in einer Wiederherstellung der gesamten 3'-UTR, es werden also auch die ab 1009bp weiter strangabwärts liegenden Teile der 3'-UTR, die im erweiterten Vektor nicht enthalten sind, ergänzt.

Abbildung 25 gibt eine Übersicht über die jeweiligen Amplifikationsprodukte der einzelnen PCRs in den jeweils genannten Integrationszuständen und zeigt die

---

<sup>5</sup> Atypische Integrationen des Vektors an anderen Orten sind in Einzelfällen dennoch möglich (siehe Klon #4 7.4.3 oder Klon #3 7.3.3)

Ergebnisse und eine Auswertungstabelle der PCRs. Es ergibt sich, dass die Klone #1, 3 und 7 mehrfach am 5'-Bereich integriert haben, die Klone #2 und #5 mehrfach am 3'-Bereich und der Klon #6 an beiden Bereichen. Die Klone #8, 9, 10 und 11 haben einfach am 5'-Bereich integriert. Klon #4 wies in PCR 1 eine starke Bande bei 6kbp auf, nicht passend zum erwarteten Produkt von 4kbp. Somit bestehen die Möglichkeiten, dass Klon #4 a) einfach am 3'-Bereich integriert hat, und das PCR-Produkt als unspezifisch zu werten ist oder b) Klon #4 eine atypische Integration an einem unbekannten Ort aufweist und somit als Mehrfachintegration zu werten wäre.

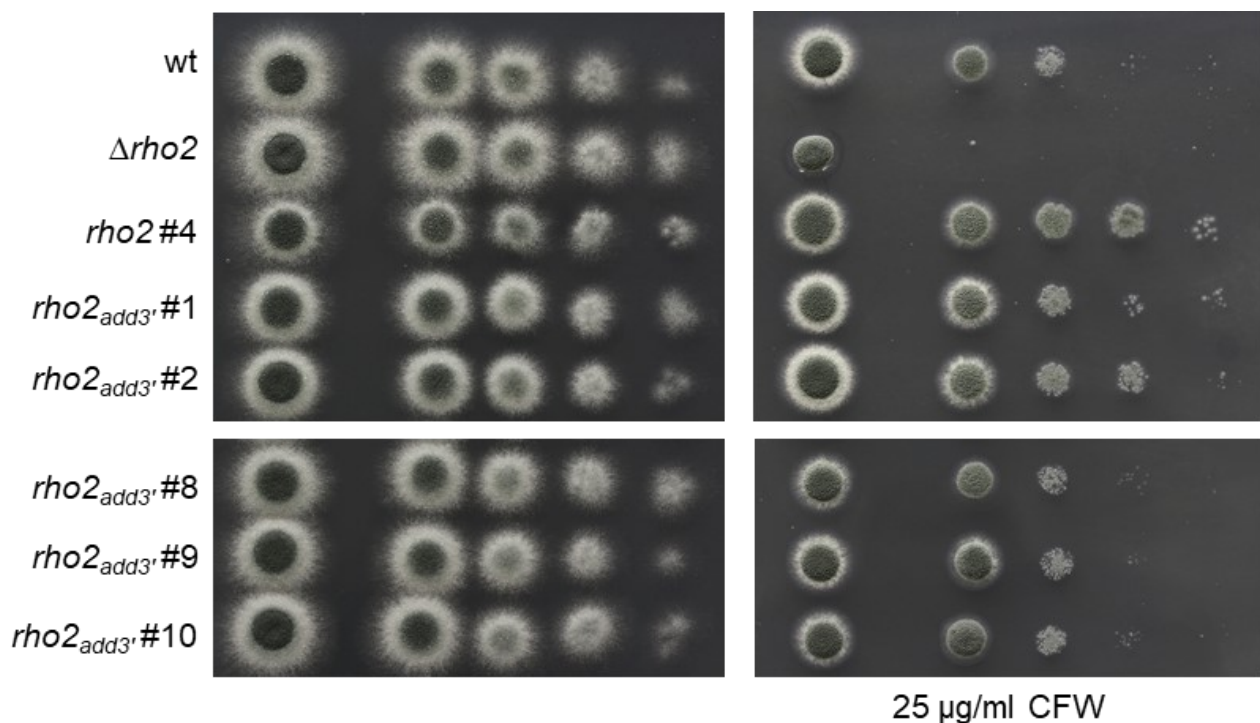


**Abbildung 25:** Übersichtsbild der PCR-Analysen von  $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$ . In **(A)** sind die PCR-Ergebnisse der Klone #1 - #11 gezeigt, daneben eine Auswertungstabelle bezogen auf die vier gezeigten Zustände I-IV in **(B)** sowie dem nicht gezeigten Zustand V (mehrfache Integration an beiden Orten). Es ergibt sich, dass die Klone #1, 3 und 7 mehrfach am 5'-Bereich integriert haben, die Klone #2 und #5 mehrfach am 3'-Bereich und der Klon #6 an beiden Bereichen. Die Klone #8, 9, 10 und 11 weisen eine Integration am 3'-Bereich auf. Klon #4 (mit einem Asterix markiert) lieferte ein unklares PCR-Produkt in PCR 1 und wurde in den folgenden Experimente ausgeschlossen. Eine Übersicht über die vier Zustände I-IV nach Integration zeigt **(B)**. I zeigt eine einfache Integration am 5'-Bereich, II eine einfache Integration am 3'-Bereich, III eine mehrfache Integration am 5'-Bereich, IV eine mehrfache Integration am 3'-Bereich. In Grau dargestellt ist der eingebrachte Vektor (dunkelgrau dargestellt ist das Gen *rho2*), weiß sind flankierende Bereiche des Pilzgenoms. Blau dargestellt ist die Hygromycin-Resistenzkassette der Deletionskassette von  $\Delta\rho2$ .

#### 7.4.4 Einzelne Integration von pDR003 führt zu reduzierter Zellwandstressresistenz auf Wildtypniveau im Tüpfeltest

Analog zu 7.3.4 wurden Tüpfeltests durchgeführt, um die neuen Komplementanten  $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$  auf bei  $\Delta\rho2 + \rho2$  beobachtete erhöhte Resistenz gegenüber CFW zu prüfen. Aufgrund der bestehenden Unsicherheit bzgl. seiner Integration (siehe 7.4.3) wurde Klon #4 nicht mitgeführt, es erfolgte die exemplarische Auswahl der Klone #1, 2, 8, 9 und 10.

Der Tüpfeltest ist abgebildet in Abbildung 26. Interessanterweise zeigen die am 5'-Bereich einzeln integrierten Klone #8, 9 und 10 wieder eine Sensibilität ähnlich dem Wildtyp. Die Klone  $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$  #1 und #2 weisen jedoch eine ähnlich erhöhte



**Abbildung 26:** Klone der Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$  mit einzelner Integration zeigen eine Sensibilität gegenüber CFW auf Wildtypniveau. Dargestellt sind die bereits bekannten Stämme Wildtyp,  $\Delta\rho2$  und  $\Delta\rho2 + \rho2\#4$  (hier:  $\rho2\#4$ ) sowie die Klone #1,2,4,8,9,10 des neu konstruierten Vektors pDR003. Agarplatten mit Aspergillus Minimalmedium (AMM) wurden vorbereitet, in die hier rechts dargestellte Platte wurde Calfochlorweiß (CFW) in einer finalen Konzentration von 25µg/ml beigefügt. *A. fumigatus* Sporen der angegebenen Stämme wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben in einer von links nach rechts absteigenden Verdünnungsreihe in einem Volumen von 3µl aufgetropft und anschließend bei 37° C für 34h inkubiert. Anschließend wurden die Platten fotografiert.

Resistenz gegenüber CFW auf wie der Referenzklon  $\Delta\rho2 + \rho2 \#4$ . Klon #1 und #2 haben jeweils mehrfach integriert (am 5' bzw. 3'-Bereich).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den am 3'-Bereich erweiterten Vektor pDR003 eine Reduktion der erhöhten CFW-Resistenz zurück auf Wildtypniveau zu erreichen ist.

## **7.5 Induktion einer konditionellen $\rho2$ -Mutante erhöht die Stressresistenz**

Die Komplementationsmutanten  $\Delta\rho2 + \rho2_{add3'}$  weisen bei einzelner Integration eine Reduktion der CFW-Sensibilität auf Wildtypniveau auf. Dies ist ein unterstützender Hinweis für unsere Hypothese, dass die beobachtete erhöhte Zellwandstressresistenz der Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2 \#4$  vom Expressionslevel von  $\rho2$  abhängt. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, wurde wie in 6.6.5 beschrieben eine konditionelle  $\rho2$ -Mutante  $\rho2_{teton}$  erstellt. Hierbei wurde der Wildtyp-Promoter durch einen konditionellen Promoter ersetzt, welcher durch Doxycyclin induziert werden kann<sup>175</sup>. Entsprechende konditionelle Mutanten verhalten sich unter reprimierten Bedingungen (ohne Zugabe von Doxycyclin) ähnlich wie eine Deletionsmutante. Bei Zugabe von Doxycyclin in großer Menge findet abhängig vom verwendeten Promotersystem und der Expressionsstärke des nativen Promoters eine mehr oder weniger starke Expression statt.

### **7.5.1 Untersuchung der Resistenz gegenüber Zellwandstress im Tüpfeltest**

Analog zu den Experimenten in 7.3.4 und 7.4.4 testeten wir die erstellten konditionellen Mutanten auf Zellwandstressresistenz im Tüpfeltest gegenüber CFW. Verwendet wurde wie zuvor AMM. Die getesteten Bedingungen waren a) ohne Zugabe von Doxycyclin oder CFW b) Zugabe von Doxycyclin in der Konzentration 7,5 µg/ml was einer starken Promoter-Aktivierung entspricht c) Zugabe von CFW in einer Konzentration von 25µg/ml und d) Zugabe von Doxycyclin 7,5 µg/ml und CFW 25µg/ml.

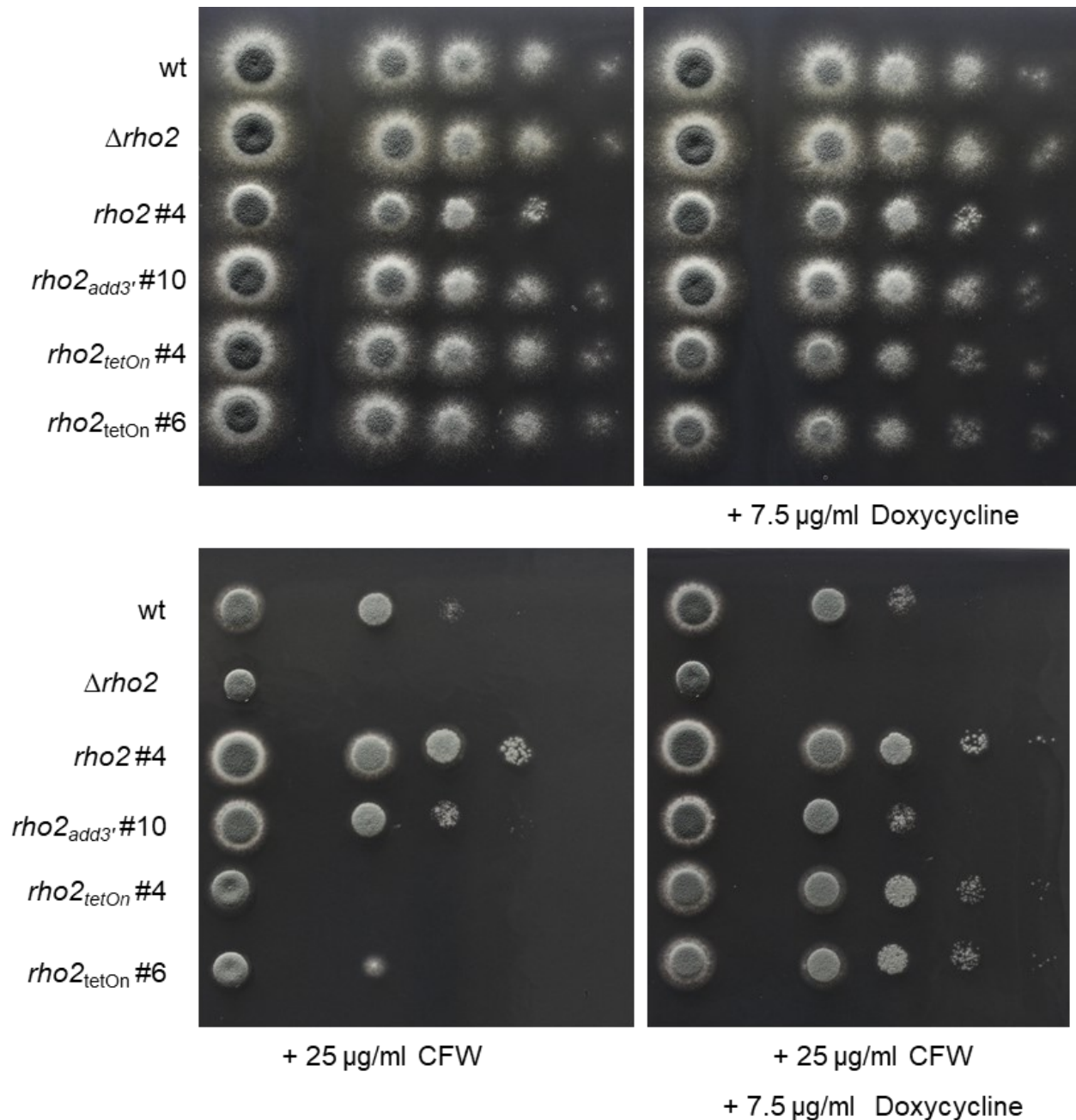
Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse: Unter Zugabe von CFW zeigen die konditionellen Mutanten ohne Doxycyclin wie die Deletionsmutante  $\Delta\rho2$  eine erhöhte Sensibilität gegenüber CFW auf. Unter Einfluss von CFW und 7,5µg/ml Doxycyclin verhalten sich

die konditionellen Mutanten wie die Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  (Referenzklon #4).

Unter Ruhebedingungen zeigte nur die Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  kleinere Kolonien im Vergleich zu den anderen Stämmen, unter Zugabe von Doxycyclin ohne CFW weisen auch die beiden Klone der konditionellen Mutante diesen Phänotyp auf.

Der Klon  $\Delta\rho2 + \rho2_{\text{add3'}}$  #10 wies wie in Abbildung 26 einen Phänotyp ähnlich dem Wildtyp auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Expression des konditionellen Promoters  $\rho2_{\text{teton}}$  zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Zellwandstresser CFW sowie einer verminderten Wachstumsgeschwindigkeit ähnlich der Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  führt, während die beiden Stämme  $\rho2_{\text{teton}}$  #4 und #6 unter reprimierten Bedingungen eine verminderte Zellwandstressresistenz ähnlich der Deletionsmutante  $\Delta\rho2$  aufweisen. Aufgrund der entsprechenden Ähnlichkeiten der Phänotypen kann angenommen werden, dass unter induzierten Bedingungen eine Überexpression, unter reprimierten Bedingungen eine verminderte Expression von  $\rho2$  stattfindet.



**Abbildung 27:** Klone der konditionellen Mutante *rho2*<sub>tetOn</sub> zeigen in reprimierten Bedingungen einen Phänotyp ähnlich  $\Delta\rho2$ , in induzierten Bedingungen unter Zugabe von Doxycyclin einen Phänotyp ähnlich  $\Delta\rho2$  + *rho2*. Agarplatten mit Aspergillus Minimalmedium (AMM) wurden vorbereitet, sofern angegeben, wurde Calfoclorweiß (CFW) in einer finalen Konzentration von 25µg/ml sowie Doxycyclin in einer finalen Konzentration von 7,5µg/ml beigefügt. *A. fumigatus* Sporen der angegebenen Stämme wurden in einer von links nach rechts absteigenden 1:10 Verdünnungsreihe in einem Volumen von 3µl aufgetropft und anschließend bei 37° C für 34h inkubiert. Anschließend wurden die Platten fotografiert.

### 7.5.2 Untersuchung der Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten

Es konnte gezeigt werden, dass die konditionelle Mutante *rho2<sub>tet</sub>* unter induzierten Bedingungen eine erhöhte Zellwandstressresistenz ähnlich der Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  aufweist. Unter reprimierten Bedingungen besteht eine erhöhte Sensibilität analog zur Deletionsmutante  $\Delta\rho2$ . Im nächsten Schritt wurde die Resistenz des Stamms gegenüber neutrophilen Granulozyten überprüft. Analog zum in 7.2 durchgeführten Experiment wurden die Hyphen nach einer Wachstumszeit von 10h mit neutrophilen Granulozyten ( $1,5 \times 10^6$  pro Well) konfrontiert und für 2h gemeinsam inkubiert, anschließend das Überleben mithilfe der

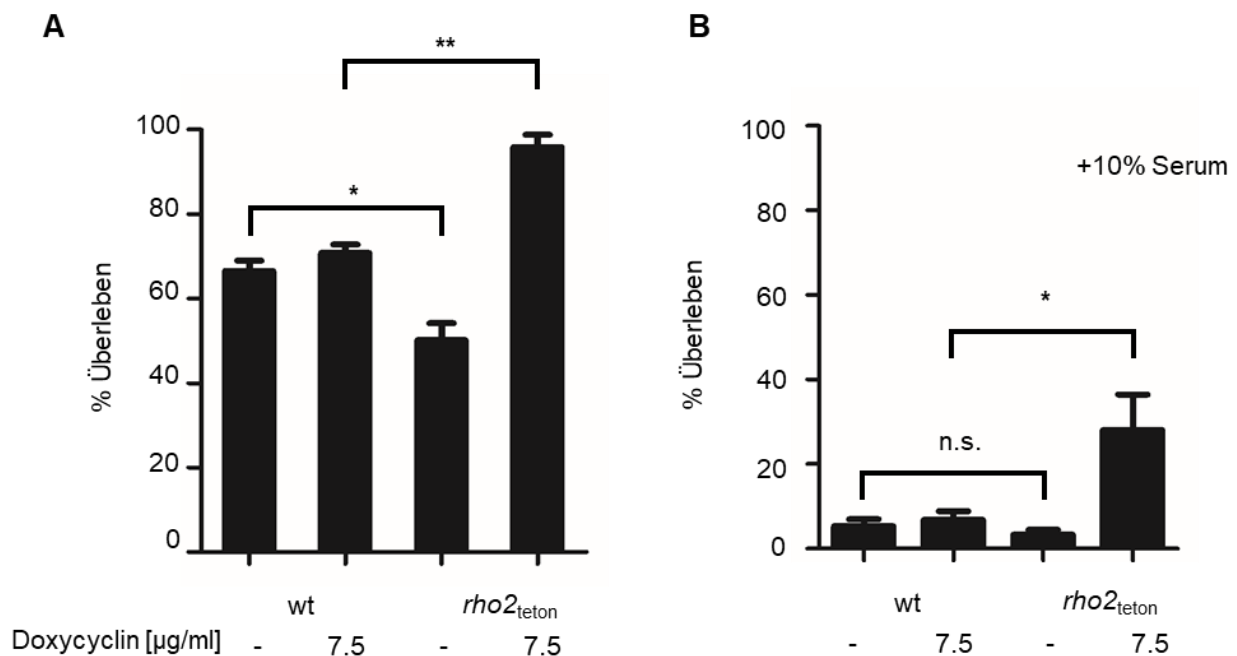


Abbildung 28: Die konditionelle Mutante *rho2<sub>tet</sub>* weist ohne den Induktor Doxycyclin eine erhöhte Sensibilität, unter Zugabe von Doxycyclin eine erhöhte Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten mit und ohne Zugabe von Serum auf. **A.** *Aspergillus fumigatus* Sporen mit mitochondrialem GFP wurden in RPMI-1640 ausgesät, sofern angegebene wurde Doxycyclin in einer Konzentration von  $7,5\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Im rechts dargestellten Graphen wurde nach 9,5h Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$  humanes Serum in einer finalen Konzentration von 10% zugegeben. 30mins später erfolgte die Zugabe von PMNs. Nach weiteren 120min gemeinsamer Inkubation wurden die Proben fixiert und anschließend mit CFW gefärbt. Dabei wurden Hyphen als vital definiert, die in  $>60\%$  des Hyphenkörpers tubuläre oder lediglich teilweise fragmentierte Mitochondrien aufwiesen. Statistische Signifikanztestung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison post-test. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , n.s. = nicht signifikant). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Alle abgebildeten Graphen basieren auf drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimenten.

mitochondrialen Morphologie bestimmt. Verglichen wurden dabei Wildtyp und *rho2<sub>tet</sub>* jeweils mit und ohne Doxycyclin (7,5µg/ml). In einem zweiten Ansatz wurde in allen Wells 30 min vor Zugabe der Granulozyten humanes Serum in einer finalen Konzentration von 10% zugegeben.

Im Ergebnis wies der Stamm *rho2<sub>tet</sub>* unter reprimierten Bedingungen ohne Zugabe von Serum eine signifikant erhöhte Sensibilität (Überleben *rho2<sub>tet</sub>* von 15% vs. Wildtyp 60%) gegenüber der fungiziden Aktivität neutrophiler Granulozyten auf, unter induzierten Bedingungen war eine signifikant gesteigerte Resistenz (Überleben *rho2<sub>tet</sub>* ca. 95%) zu beobachten (Abbildung 28 A).

Unter Zugabe von Serum kam es insgesamt zu einer starken Zunahme der fungiziden Aktivität der PMNs, es resultierte ein durchschnittliches Überleben des Wildtypstamms von 10% (Abbildung 28 B). In der Folge waren Unterschiede zwischen den einzelnen Wells mit Wildtyp (mit und ohne Doxycyclin) sowie den Wells von *rho2<sub>tet</sub>* ohne

Doxycyclin nicht mehr signifikant. Der Stamm *rho2<sub>tet</sub>* mit Zugabe von Doxycyclin wies eine signifikant erhöhte Überlebensrate von ca. 30% auf (Abbildung 28 B).

Die Zugabe von Doxycyclin zeigte beim Wildtypstamm keine signifikante Auswirkung auf das Überleben. Ein relevanter fungizider oder die Granulozyten beeinflussender Effekt ist somit unwahrscheinlich. In 7.1.6 konnte bereits gezeigt werden, dass humanes Serum allein keinen Einfluss auf das Pilzüberleben zeigt.

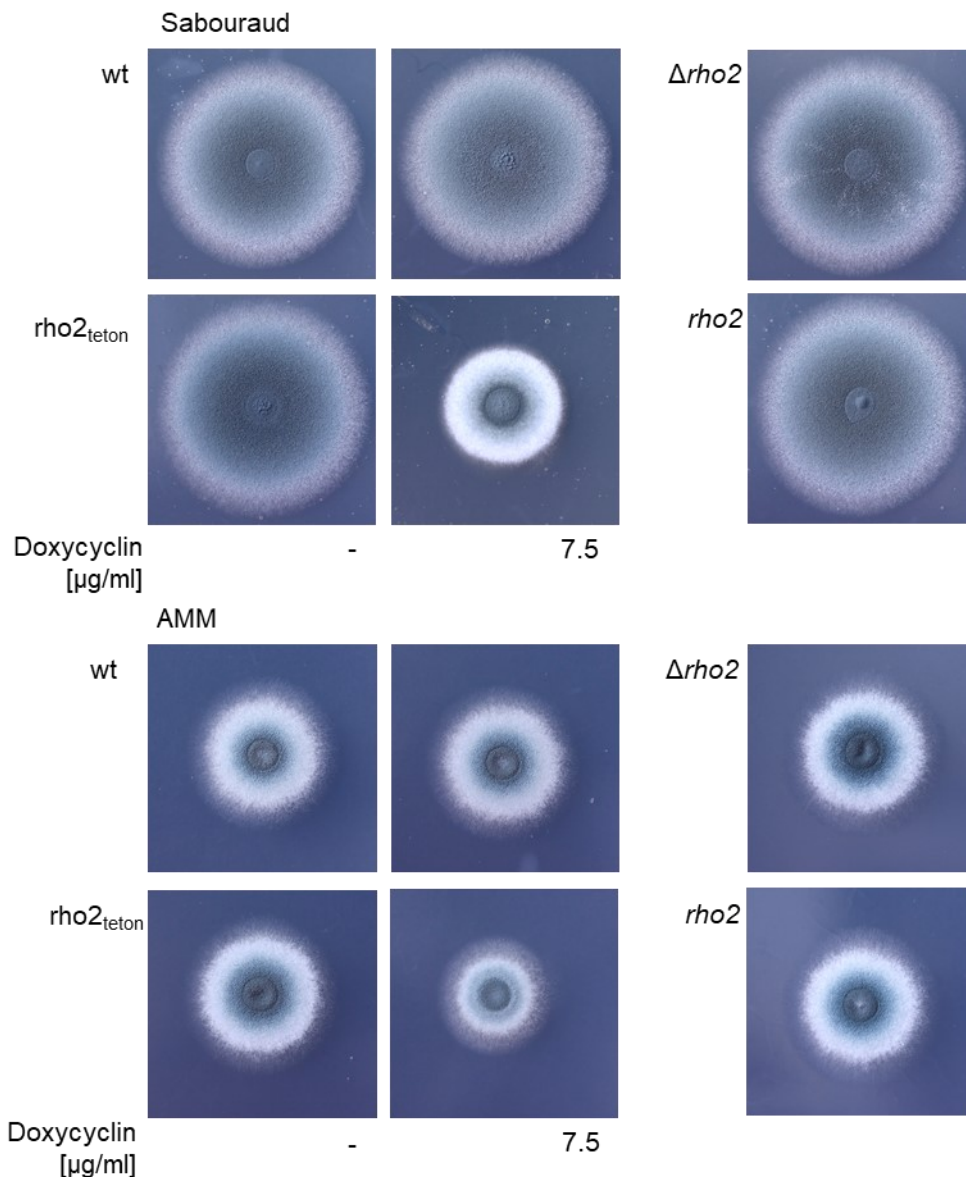
## **7.6 *rho2<sub>tet</sub>* weist unter induzierten Bedingungen eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit auf**

Bereits in früheren Versuchen fiel die auffällig reduzierte Koloniegröße von *rho2<sub>tet</sub>* unter supprimierten Bedingungen sowie von  $\Delta\rho2 + \rho2$  auf (siehe entsprechende Experimente in 7.3.1, 7.3.4, 7.4.4 und 7.5.1). Nun wurden ergänzend radiäre Wachstumstests durchgeführt. Dabei wurden zentral auf eine Agarplatte Sporen aufgebracht und dann bei 37°C inkubiert. Nach 46h wurde der Kolonieradius ausgemessen. Das Experiment wurde mit AMM und dem Komplexmedium Sabouraud durchgeführt. Signifikanzberechnungen wurden mittels one-way-ANOVA und Tukey's



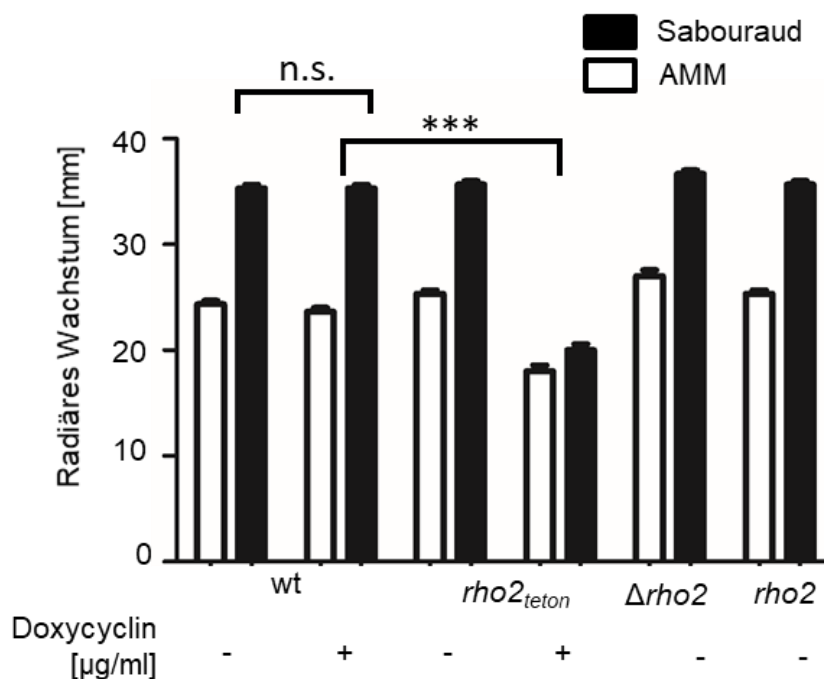
multiple comparison post-test durchgeführt. Gezeigt sind die Daten drei unabhängig voneinander durchgeführter Experimente.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 und Abbildung 30 zu sehen. Deutlich erkennbar ist das verlangsamte Wachstum von *rho2<sub>tet</sub>* unter Zugabe von Doxycyclin. Im Gegensatz zu bisherigen Tüpfeltest weist  $\Delta\rho2 + \rho2$  („*rho2*“ in der Abbildung) überraschenderweise keine signifikant verminderte Wachstumsgeschwindigkeit auf. Anzumerken ist jedoch, dass die Inkubationszeit beim radiären Wachstumstest im



**Abbildung 29:** Die konditionelle Mutante *rho2<sub>tet</sub>* weist unter induzierten Bedingungen ein vermindertes radiäres Wachstum auf. Für dieses Experiment wurden  $1,5 \times 10^5/3\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O suspendierte Sporen auf AMM- bzw. Sabouraud-Agarplatten getropft und für 46h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Kolonieradius mittels einem Lineal ausgemessen und die Platten fotografiert.

Vergleich zum Tüpfeltest mit 46 vs. 32h deutlich verlängert ist. Vor allem bei Wachstum auf AMM entsteht der Eindruck, dass  $\Delta\rho2 + \rho2$  am Kolonierand im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Myzeldichte aufweist: Der Radius des grünen Sporenrasens ist geringer, die fransenartigen Ausläufer des Myzels stärker ausgeprägt. Nur auf AMM wächst  $\Delta\rho2$  signifikant schneller im Vergleich zu Wildtyp, die Wachstumsgeschwindigkeit von  $\rho2_{\text{teton}}$  ohne Zugabe von Doxycyclin ist im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verändert. Die Zugabe von Doxycyclin zeigte beim Wildtyp keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit.



**Abbildung 30:** Auswertung des radiären Wachstumstests: Die konditionelle Mutante  $\rho2_{\text{teton}}$  weist unter induzierten Bedingungen ein vermindertes radiäres Wachstum auf. Für dieses Experiment wurden  $1,5 \times 10^5$  im 3µl ddH<sub>2</sub>O gelöste Sporen auf AMM- bzw. Sabouraud-Agarplatten getropft und für 46h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten fotografiert und der Kolonieradius mittel einem Lineal ausgemessen. Signifikanzberechnung erfolgte mittels one-way-ANOVA und Tukey's post-test. In AMM waren signifikant unterschiedlich die Gegenüberstellungen Wildtyp ohne Doxycyclin vs.  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin, Wildtyp mit Doxycyclin vs.  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin (jeweils  $p < 0,001$ ) sowie Wildtyp ohne Doxycyclin vs.  $\Delta\rho2$  und Wildtyp mit Doxycyclin vs.  $\Delta\rho2$  ( $p < 0,01$ ). Zudem signifikant unterschiedlich war die Gegenüberstellung  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin vs.  $\rho2_{\text{teton}}$  ohne Doxycyclin ( $p < 0,001$ ),  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin vs.  $\Delta\rho2$  ( $p < 0,001$ ) sowie  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin vs.  $\Delta\rho2 + \rho2$  ( $p < 0,001$ ). In Sabouraud waren signifikant unterschiedlich die Gegenüberstellungen Wildtyp ohne Doxycyclin vs.  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin, Wildtyp mit Doxycyclin vs.  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin (jeweils  $p < 0,001$ ),  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin vs.  $\rho2_{\text{teton}}$  ohne Doxycyclin ( $p < 0,001$ ),  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin vs.  $\Delta\rho2$  ( $p < 0,001$ ) sowie  $\rho2_{\text{teton}}$  mit Doxycyclin vs.  $\Delta\rho2 + \rho2$  ( $p < 0,001$ ).

## 7.7 Die Virulenz der Deletionsmutante $\Delta\rho2$ ist reduziert in *Galleria melonella*

Infektionsversuche im wirbellosen Insekt *Galleria melonella* (dt. Trivialname „Bienenmade“) stellen ein etabliertes *in vivo* Infektionsmodell für pathogene Pilze dar<sup>48,49</sup>. Da  $\Delta\rho2$  eine erhöhte Sensibilität und  $\Delta\rho2 + \rho2$  eine erhöhte Resistenz gegenüber der antifungalen Aktivität neutrophiler Granulozyten aufweisen (siehe 7.2), ergab sich die Frage, inwieweit  $\rho2$  auch Einfluss auf die Virulenz hat.

Um dies zu untersuchen, wurde ein *in vivo* Infektionsversuch in *Galleria melonella* mit den Stämmen Wildtyp,  $\Delta\rho2$  sowie  $\Delta\rho2 + \rho2$  (Referenzklon #4) durchgeführt. Ergänzend wurden Kontrollgruppen mitgeführt, welche entweder überhaupt nicht oder nur mit destilliertem Wasser („Wasserkontrolle“) beimpft wurden. Pro Gruppe wurden insgesamt 60 Maden eingeschlossen. Die Zuteilung in die Gruppen erfolgte (mit Ausnahme der Negativkontrollgruppe) verblindet.

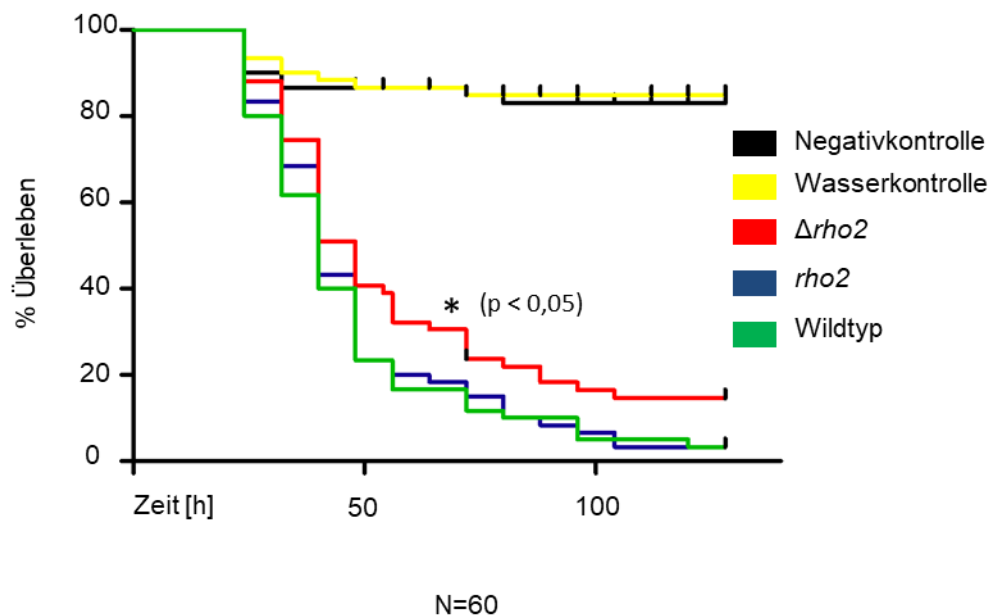


Abbildung 31: *In vivo* Infektionsversuch in der Bienenmade *Galleria mellonella* zeigt ein signifikant gesteigertes Überleben von mit  $\Delta\rho2$  infizierten Maden. Frische (<24h Lagerzeit beim Händler) Bienenmaden wurden mittels einer 24 Gauge Injektionskanüle entweder jeweils mit  $5 \times 10^5$  Sporen angegebener Stämme oder mit ddH<sub>2</sub>O beimpft und anschließend im Dunklen in 10er Gruppen bei 37°C gehalten. Alle 8h erfolgte eine Zählung abgestorbener Maden und ggf. die Entfernung dieser aus dem Versuch. Sich verpuppende Maden wurden zensiert und aus dem Pool entfernt. Abgebildet sind die Daten von 60 infizierten Maden je Stamm, dargestellt in einer Kaplan-Mayer-Überlebenskurve. Signifikanzberechnung erfolgte mittels Log-Rank (Mantel-Cox) Test.

In der Log-Rank-Analyse nach Mantel-Cox ergibt sich ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigertes Überleben in der mit  $\Delta\rho2$  beimpften Gruppe. Ohne Signifikanz blieb der Überlebensvergleich des Wildtyps zu  $\Delta\rho2 + \rho2$  (siehe Abbildung 31).

Zu beachten ist die hohe Überlebensrate der nicht oder lediglich mit Wasser beimpften Maden auch insbesondere über den langen Zeitraum von  $>100\text{h}$ , wobei es in diesen Gruppen häufig zu in Zensuren resultierenden Verpuppungen der Tiere kam.

## 8 Diskussion

### 8.1 mitoFLARE als neue Methode zur Lebend-/Totdifferenzierung

Immunzellen, Antimykotika sowie chemischen Noxen, Temperatur oder UV-Licht können fungizide, fungistatische oder auch kombinierte Effekte auf pathogene Pilzerreger ausüben. Um diese Effekte zu quantifizieren und voneinander zu unterscheiden, ist eine zuverlässige Lebend-/Totdifferenzierung in Form eines funktionierenden *killing Assay* eine Grundvoraussetzung. Bisher publizierte Forschungsarbeiten verwendeten für *A. fumigatus* im Wesentlichen drei methodische Ansätze: Indirekte, metabolisch-colorimetrische Ansätze sowie direkte mikroskopische Lebend-/Totquantifizierung mittels zugegebener Färbesubstanzen oder mithilfe von cytosolischer GFP-Fluoreszenz<sup>69,155,157,160,165,167,168,170,187</sup>. Jede dieser Methoden weist dabei Limitationen auf (siehe auch 5.10). Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, eine neue Methode zur Lebend-/Totdifferenzierung von *A. fumigatus* zu etablieren und in deren Anwendung zu prüfen. Es konnte gezeigt werden, dass Änderungen in der mittels mitochondrialem GFP visualisierten mitochondrialen Morphologie mit Stress, Zellschaden und Zelltod von *A. fumigatus* korrelieren. Fungizide Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder von Antimykotika führen genauso wie neutrophile Granulozyten zu derselben schwerwiegenden Störung des mitochondrialen Netzwerks in Form von Fragmentierung, Clustering und Erlöschen der Fluoreszenz. U.a. durch Videomikroskopie sowie durch die Anwendung eines metabolisch-colorimetrischen Assays konnte gezeigt werden, dass Hyphen mit solch schwerwiegenden Änderungen der mitochondrialen Morphologie kein Wachstum mehr aufweisen. In Anlehnung an die bereits publizierte FLARE-Methode<sup>157,170</sup> (FLARE steht für Fluorescent Aspergillus Reporter, siehe hierzu 5.10), nannten wir diese neue Methode „mitoFLARE“.

#### 8.1.1 Vergleich zu metabolisch-colorimetrischen Methoden

In metabolisch-colorimetrischen Ansätzen können fungizide bzw. fungistatische Effekte vollständig verschleiert werden: Im Resazurin-basierten Experiment von Kapitel 7.1.6 wurde überraschenderweise festgestellt, dass im Gegensatz zur mikroskopischen Auswertung via mitoFLARE die Zugabe von  $1,5 \times 10^6$  PMNs im Vergleich zur

Kontrollgruppe ohne Zugabe von Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumskurve von *A. fumigatus* zu haben scheint. Allerdings wurde auch beobachtet, dass die Zugabe einer vergleichbaren Zahl von durch Eiswasser lysierten humanen Zellen die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen deutlich erhöht. Dieser Effekt war in schwächerem Umfang auch bei alleiniger Zugabe von Serum zu beobachten. Zu erklären sind diese Effekte vermutlich durch den entstandenen höheren Nährstoffgehalt im ansonsten einem Minimalmedium entsprechendem RPMI-1640 („Fütterungseffekt“). Somit wird ein wesentlicher Störfaktor offenbar: Die scheinbar fehlende Abflachung der Wachstumskurve unter Zugabe von PMNs ohne Serum ist in Wahrheit auf eine Linksverschiebung der Wachstumskurve durch den „Fütterungseffekt“ zurückzuführen. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit adäquater Kontrollgruppen insbesondere bei indirekten Methoden wie der metabolisch-colorimetrischen Resazurin-Methode. Als adäquate Kontrollgruppe für die Probengefäße mit Zugabe von PMNs sollten Probengefäße mit Zugabe lysierter Zellen dienen. Damit wird nicht nur ein deutlicher, zuvor verschleierter Einfluss unter Zugabe von PMNs ohne Serum sichtbar, sondern auch der verstärkende Einfluss von PMNs mit Serum betont. Durch den „Fütterungseffekt“ werden außerdem mögliche Kritikpunkte entkräftet, die die beobachtete verringerte metabolische Aktivität unter Zugabe von PMN + Serum auf die Anwesenheit inhibitorischer/fungizider Substanzen im Serum oder aus lysierten Granulozyten zurückführen.

Eine entscheidende weitere Stärke von mitoFLARE gegenüber metabolisch-colorimetrischen Verfahren ist die zuverlässige, spezifische Früherkennung von Stress gegenüber *A. fumigatus* Hyphen: Während metabolisch-colorimetrische Ansätze abhängig von der Anzahl der eingesetzten Sporen erst nach einer Inkubation von vielen Stunden überhaupt erst Wachstum im Probengefäß nachweisen, sind Effekte auf die mitochondriale Morphologie bereits nach wenigen Minuten sichtbar. Wie wichtig dies ist, wird deutlich, wenn man den steilen Anstieg der Wachstumskurven der Resazurin-basierten Experimente betrachtet: Dieses exponentielle „Überwachsen“ von Probengefäßen macht es nach längerer Inkubationszeit schwer, schwächer ausgeprägte Effekte oder früh stattfindende fungizide oder inhibitorische Effekte noch zu detektieren.

### 8.1.2 Vergleich zu Methoden basierend auf zugegebenen Färbesubstanzen

Neben einem indirekten Lebend-/Totnachweis über den Metabolismus ist es möglich, die Vitalität von *A. fumigatus* Hyphen mithilfe von Färbesubstanzen wie Propidium-Iodid (PI) oder FUN-1 zu bestimmen<sup>167–169,188,189</sup>. Das Färbeverhalten von PI wird dabei maßgeblich von der Permeabilität der Zellmembran beeinflusst, was mitunter zu falschen Ergebnissen führt<sup>188</sup>. Für FUN-1 wurde gezeigt, dass dessen Färbeverhalten sich etwa bei Zugabe von Antimykotika wie Voriconazol sowie bei unterschiedlicher Inkubationsdauer deutlich verändert<sup>189</sup>. Ein entscheidender Nachteil ergibt sich zudem bei der Anwesenheit von Immunzellen: Diese werden etwa bei der häufig verwendeten Färbesubstanz FUN-1<sup>167,188</sup> mit angefärbt. Da unter den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen eine große Zahl von Immunzellen auf den Hyphen zum Liegen kommen, würde die Detektion von Farbumschlägen oder Fluoreszenz darunter liegender Hyphen hierdurch erheblich erschwert werden. Um diesem Problem zu begegnen, könnte man in einem zusätzlichen Arbeitsschritt Immunzellen beispielsweise durch die Zugabe von Eiswasser lysieren und einen Großteil nach Abzug des Mediums aus dem Well entfernen. Dabei geht jedoch einerseits der Aspekt der Beobachtung einer direkten mikroskopischen Immun-Pathogen-Interaktion verloren, andererseits ist der Einfluss von Eiswasser auf das Färbeverhalten der Hyphen kritisch zu überprüfen.

Im Vergleich hierzu ist mitoFLARE unabhängig von zugegebenen Reagenzien zur Lebend-/Totdifferenzierung, unter den gewählten experimentellen Bedingungen weisen >99% der Hyphen eine Expression von mitochondrialem GFP auf.

### 8.1.3 Vergleich zu Methoden basierend auf cytosolischer Fluoreszenz

Ein weiterer alternativer Ansatz der mikroskopischen Lebend-/Totdifferenzierung stellt prinzipiell die Verwendung cytosolischer Fluoreszenz nach dem direkten Vorbild von FLARE<sup>157,170</sup> dar. Wie in 7.1.3 dargelegt, weist die Verwendung cytosolischer Fluoreszenz bei *A. fumigatus* in Hyphenform erhebliche Limitationen auf, da auch nach mehreren Stunden Einwirkzeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in fungizider Konzentration Hyphen mit cytosolischem GFP weiterhin bestehende Fluoreszenz zeigen und optisch nicht von der Kontrollgruppe ohne Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu unterscheiden sind. Im Gegensatz dazu

weisen Hyphen mit mitochondrialem GFP im gleichen Ansatz deutliche Zeichen einer mitochondrialen Netzwerkstörung bzw. teilweise sogar verblasste Fluoreszenz auf. Dies unterstreicht die Fähigkeit der in dieser Arbeit etablierten Methode, fungizide Effekte früh und zuverlässig zu erkennen und stellt somit eine klare Verbesserung von FLARE dar.

#### **8.1.4 Einsatz von mitoFLARE bei immunologischen Fragestellungen**

Die Interaktion zwischen mehrzelligen pathogenen Organismen wie *A. fumigatus* und dem humanen Immunsystem ist komplex und nicht vollständig verstanden. Während diese Arbeit den Fokus auf die Pilzseite der Immun-Pathogen-Interaktion setzte, sind speziellere immunologische Fragestellungen eine weitere Anwendungsmöglichkeit.

Die antifungale Aktivität der neutrophilen Granulozyten konnte in mehreren Versuchen deutlich durch die Zugabe von Lipopolysaccharid oder humanem Serum gesteigert werden (siehe 7.1.5 und 7.1.7.). Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für viele mögliche weitere Untersuchungen im Bereich der immunologischen Pilzforschung, da Effekte diverser Immunstimulanzien direkt auf Zellniveau sichtbar gemacht und quantifiziert werden können.

Neutrophile Granulozyten erkennen Hyphen vermutlich maßgeblich durch den Immunrezeptor Dectin-1, welcher den Zellwandbaustein  $\beta$ -1,3-Glucan bindet<sup>1,70</sup>. Es wurde gezeigt, dass *Dectin-1* <sup>-/-</sup> Knock-out-Mäuse neben einer generell erhöhten Sterblichkeit gegenüber einer Infektion mit *A. fumigatus* Sporen eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe aufweisen<sup>70,190</sup>. MitoFLARE könnte nun eine Möglichkeit bieten zu untersuchen, ob *A. fumigatus* Hyphen beispielsweise durch murine neutrophile *Dectin-1* <sup>-/-</sup> Granulozyten noch effektiv bekämpft und abgetötet werden können.

Neben neutrophilen Granulozyten ist ein Einsatz von mitoFLARE auch mit anderen Effektoren des Immunsystems wie etwa Alveolarmakrophagen, dendritischen Zellen oder natürlichen Killerzellen möglich. Dies bietet einen Ansatzpunkt für viele Fragestellungen und Experimente, wie etwa ein Vergleich der durchschnittlichen Abtötungsrate von *A. fumigatus* Hyphen seitens unterschiedlicher Immunzellen oder



eine Untersuchung möglicher bestehender Abhängigkeiten wie die Anwesenheit von Serum oder von anderen Immunmediatoren.

Es konnte *in vitro* mithilfe eines metabolischen Assays gezeigt werden, dass  $\beta$ -1,3-Glucan-Antikörper von Mäusen das Wachstum von *A. fumigatus* Hyphen erfolgreich verlangsamen können (es wurde ein Glucose-Umsatz von 25% im Vergleich zu Normalbedingungen gemessen)<sup>137,191</sup>. Metabolische Ansätze können Wachstumsinhibition naturgemäß schwer von einer Abtötung eines Teils der Hyphen unterscheiden. Hier wäre ein Einsatz von mitoFLARE hilfreich, um den direkten Einfluss von  $\beta$ -1,3-Glucan-Antikörpern auf die Mitochondrienmorphologie zu zeigen und schwere, mit Zelltod gleichzusetzende Störungen des mitochondrialen Netzwerks früh und sicher zu erkennen und zu quantifizieren.

#### **8.1.5 Übertragbarkeit auf andere Pilzspezies**

MitoFLARE kann auf andere Pilze übertragen werden. *S. cerevisiae*<sup>192</sup> kommt dabei prinzipiell genauso in Frage wie der fakultativ pathogene Erreger *C. albicans*<sup>193</sup> oder andere *Aspergilli* wie *Aspergillus terreus*<sup>194</sup>. Nach entsprechender Transformation des Organismus mit einem Vektor für mitochondriales GFP könnten Stressexperimente beispielsweise mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Antimykotika oder Immunzellen analog zu dieser Arbeit durchgeführt werden. Zu beachten wäre dabei jedoch die erschwerte zur Auswertung benötigte Differenzierung der unterschiedlichen mitochondrialen Morphologien bei Pilzen in Hefenform: Durch die deutlich geringere Größe könnte eine Fragmentierung der Mitochondrien schwerer zu detektieren sein, was die Quantifizierung mitochondrialer Morphologien von mehreren Hundert Pilzorganismen pro Experiment vermutlich erheblich erschweren würde.

#### **8.1.6 Limitationen von mitoFLARE**

Eine zuverlässige Erkennung der mitochondrialen Morphologieänderungen erfordert Erfahrung und Übung. Das dreidimensionale Pilzwachstum führt dazu, dass Teile von Hyphen nicht immer im gegenwärtigen mikroskopischen Fokus liegen, was viele Nach- und Zwischenjustierungen der Ebene erfordert. Weiterhin sind manche Änderungen der mitochondrialen Morphologie besonders in Zwischenstadien nur mit entsprechender Übung erkennbar.

Die Tatsache, dass in einer Hyphe gelegentlich mehrere mitochondriale Morphologien nebeneinander vorkommen, stellt prinzipiell ein Problem dar: Ab welchem Anteil des Hyphenkörpers mit schweren Störungen im mitochondrialen Netzwerk kann man vom Hyphentod ausgehen, insbesondere wenn man in Betracht zieht, dass theoretisch ein einziges überlebendes Kompartiment zu einem erneuten Auskeimen und damit Überleben des Pilzes führen kann? Solche Grenzfälle sind bei den gewählten Inkubationszeiten nicht besonders häufig, weshalb deren Einfluss in den durchgeführten Experimenten von untergeordneter Rolle erscheint. Zudem war das primäre Ziel der durchgeführten Versuche, signifikante fungizide Aktivität nachzuweisen, was nicht unbedingt bedeutet, dass 100% des Hyphenkörpers betroffen sein muss. Im etablierten Protokoll erfolgte deshalb die Definition, dass in 60% des Hyphenkörpers schwerwiegende Störungen des mitochondrialen Netzwerks nachzuweisen sein müssen, um von einer gezählten „Abtötung“ der jeweiligen Hyphe zu sprechen. Bei längeren Inkubationszeiten und vermehrter dreidimensionaler Struktur der Hyphen mit folglich schwierigerer Beurteilbarkeit (und schwererer Erreichbarkeit bestimmter Hyphenteile durch Immunzellen) könnten Hyphen mit einzelnen überlebenden Kompartimenten ein erhebliches Problem darstellen.

Wie bereits in 8.1.5 erwähnt, ist mitoFLARE für die Anwendung in *A. fumigatus* Sporen, sowie für die Anwendung bei Pilzen in Hefenform nur bedingt geeignet. Die geringe Größe der Sporen erschwert sehr eine Differenzierung vorliegender mitochondrialer Morphologien, insbesondere von deren Zwischenstadien. Denkbar wären jedoch Versuche mit nicht-fixierten Sporen, bei denen mithilfe von Videomikroskopie solche mit beweglichen Mitochondrien als Nachweis intakter mitochondrialer Dynamik von solchen mit unbeweglichen Mitochondrien unterschieden werden könnten<sup>183</sup>.

Bevor mitoFLARE als Methode implementiert werden kann, muss ein Fluoreszenzmikroskop mit entsprechend geeigneter Auflösung zur quantitativen Auswertung der Überlebensrate verfügbar sein. Abgesehen davon ist die Kosteneffizienz unserer Methode als positiv hervorzuheben: Pilzanzucht und -kultur benötigt kaum Material und Aufwand, Versuchskammern und Medien sind kommerziell und günstig zu erwerben.

## 8.2 Der Zellwandintegritätsweg als Vermittler von Sensibilität und Resistenz gegenüber Immunzellen

Es war bereits bekannt, dass Deletionsmutanten, denen Komponenten des Zellwandintegritätswegs fehlen, eine erhöhte Sensibilität gegenüber Zellwandstress aufweisen<sup>11,12,91</sup>.

Mit dem neu entwickelten Ansatz mitoFLARE war es nun möglich, einzelne Deletionsmutanten des Zellwandintegritätswegs gegenüber humanen Granulozyten zu testen. Im Ergebnis zeigt sich ein deutlich reduziertes Überleben von  $\Delta\rho2$  und  $\Delta midA$  sowie von  $\Delta\rho4$  (wobei Rho4 wahrscheinlich nicht Teil des Zellwandintegritätswegs ist<sup>11</sup>) unter Einfluss neutrophiler Granulozyten. Diese Deletionsmutanten reagieren sensibel auf Zellwandstress<sup>11,12</sup>. Es ist also zu vermuten, dass humane Granulozyten auf *A. fumigatus* signifikanten Zellwandstress ausüben und eine adäquate Antwort in Form des Zellwandintegritätswegs für ein Überleben des Pilzes wichtig ist.

Es ist bekannt, dass Immunzellen und allen voran neutrophile Granulozyten multiple Abwehrmechanismen besitzen und Fremdorganismen wie *A. fumigatus* auf verschiedene Art und Weise abzutöten vermögen<sup>1,139,145</sup>. Jedoch war bisher unklar, ob diese Abwehrmechanismen zu Zellwandstress führen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, verwendeten wir einen sogenannten Luciferin-Assay, welcher darauf basiert, dass messbare Lumineszenz in *A. fumigatus* Hyphen entsteht, sobald der Promoter der Alpha-Glucan Synthase (Ags) aktiviert wird<sup>195</sup>. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass Zellwandstress eine starke Aktivierung des Ags-Promoters bewirkt<sup>195</sup>. Unsere bisherigen nichtpublizierten Daten konnten mit dieser Methode zeigen, dass unter Einfluss neutrophiler Granulozyten in der Tat eine Aktivierung des Ags-Promoters vergleichbar mit der Aktivierung unter Einfluss von chemischen Zellwandstressoren wie CFW entsteht. Dies deutet stark darauf hin, dass Immunzellen signifikanten Zellwandstress auf *A. fumigatus* Hyphen ausüben.

Die gesteigerte Anfälligkeit von  $\Delta\rho4$  ist dabei aller Wahrscheinlichkeit nach durch das Fehlen von Septen zu erklären<sup>12,84</sup>, weshalb der Stress, den Immunzellen an einem Hyphenteil ausüben, nicht durch eine Unterteilung in Kompartimente vom Rest der Hyphe ferngehalten werden kann.

Besonders interessant ist das Ergebnis, dass die Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber neutrophiler Granulozyten aufweist. Dies bot Ansatzpunkt für viele weitere Experimente (siehe 7.3 und 7.5 sowie 8.3) zur weiteren Klärung dieses Phänomens.

Im nächsten Schritt sollte auch die Deletionsmutante  $\Delta midA$  noch eingehender untersucht werden, um mögliche Zusammenhänge zur GTPase Rho2 aufzudecken (siehe 8.3.1).

Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse erneut das Potenzial von mitoFLARE: Auf Zellebene können Einflüsse einzelner Gene auf das fungale Überleben beobachtet und quantifiziert werden. Außerhalb von den Zellwandintegritätsweg von *A. fumigatus* betreffenden Fragestellungen ist mitoFLARE auf eine Vielzahl weiterer Forschungsgebiete übertragbar. Denkbar sind „killing“-Experimente mit *A. fumigatus*-Stämmen, welche beispielsweise Deletionen von Virulenz-vermittelnden Genen aufweisen wie  $\Delta zafA^{196}$  (ein Stamm, dem ein wichtiger Transkriptionsfaktor für den Zinkmetabolismus fehlt) oder  $\Delta pksP^{169}$  (ein Stamm, dem der Farbstoff Melanin fehlt).

## **8.3 Spielt Rho2 eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Zellwandstressantwort?**

### **8.3.1 Funktion von Rho2 und Position im Zellwandintegritätsweg**

Es wurde bereits vermutet, dass die Rho-GTPase Rho2 Bestandteil des Zellwandintegritätswegs von *A. fumigatus* sein könnte, da eine Deletion des Gens zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber typischen Zellwandstressoren wie CFW und Kongorot führt<sup>11,12,83</sup> (siehe 5.6). Unklar ist jedoch die genaue Position im Integritätsweg<sup>11</sup>, mögliche vorgeschaltete Rezeptoren oder nachgeschaltete Effektorproteine sind also unbekannt.

Neu ist die ebenfalls gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Immunzellen von  $\Delta\rho2$  und  $\rho2_{\text{teton}}$  unter reprimierten Bedingungen sowie die signifikant gesteigerte Resistenz gegenüber Zellwandstress von Mutanten mit gesteigerter Expression von  $\rho2$ . Sowohl Komplementationsmutanten mit mehrfacher genetischer Integration des Komplementationsvektors, als auch die konditionelle Mutante  $\rho2_{\text{teton}}$  unter

induzierten Bedingungen weist eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte Resistenz gegenüber CFW auf. Diese erhöhte Resistenz gegenüber einem Zellwandstressor steht in Korrelation mit einer erhöhten Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten, was die Bedeutung des Zellwandintegritätswegs in der Stressantwort auf Immunzellen und die in 4.2 dargelegten Punkte erneut unterstreicht.

Eine neue Erkenntnis ist die verminderte Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes bei (wahrscheinlicher) Überexpression von *rho2*. Dabei lässt sich dieses Ergebnis im radiären Wachstumstest für *rho2<sub>tet</sub>* unter induzierten Bedingungen bestätigen, für  $\Delta\rho2 + \rho2$  ergibt sich dort kein signifikanter Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp (siehe 7.6). Im Gegensatz dazu sind in zuvor durchgeführten Tüpfeltests kleinere Koloniegrößen bei  $\Delta\rho2 + \rho2$  im Vergleich zum Wildtyp aufgefallen (siehe 7.3.1, 7.3.4, 7.4.4, 7.5.1). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass bei  $\Delta\rho2 + \rho2$  funktionale regulatorische Mechanismen des Promoters vorliegen, die trotz einer mehrfachen Integration des Komplementationskonstrukts beispielsweise ab einer gewissen Koloniegröße (die Inkubationszeit des radiären Wachstumstests ist im Vergleich zum Tüpfeltest deutlich länger) einer erhöhten Expressionsrate von *rho2* teilweise gegensteuern. Im Gegensatz hierzu wird der konditionelle Promoter von *rho2<sub>tet</sub>* durch das im Medium vorliegende Doxycyclin dauerhaft aktiviert, wodurch vorhandene regulatorische Elemente nicht zum Tragen kommen können.

Eine mögliche Erklärung des Phänotyps der gesteigerten Resistenz und verlangsamten Wachstums wäre, dass unter Überexpression von *rho2* eine verdickte bzw. anders zusammengesetzte Zellwand entsteht. Der Pilz ist dadurch widerstandsfähiger, wächst jedoch etwa z.B. aufgrund erhöhten Energiebedarfs oder „Breiten“- statt Längenwachstums verzögert. Bildlich gesprochen würde ein langsam wachsender, aber dick „gepanzelter“ Organismus entstehen, der resistent gegenüber Stressbedingungen ist, die seine Panzerung bzw. Zellwand betreffen. Unter lichtmikroskopischen Vergrößerungen ist ein offensichtlicher phänotypischer Unterschied der Komplementationsmutante  $\Delta\rho2 + \rho2$  und *rho2<sub>tet</sub>* unter induzierten Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp im Wachstumsverhalten bis auf ein insgesamt verlangsamtes Wachstum nicht zu erkennen, wobei die Zellwand in der maximal erreichbaren 1000x Vergrößerung nicht genau darstellbar ist. Interessant

wären daher elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellwand, ob sich beispielsweise deren Dicke oder Morphologie verändert.

Auf molekularer Ebene wäre ein möglicher Wirkmechanismus, dass Rho2 als weiterer Effektor stromaufwärts des bekannten MAP-Kinase-Moduls Bck2/mkk2/MpKA<sup>55,80</sup> sitzt. Eine Phosphorylierung von Bck2/mkk2/MpKA führt im Zellkern zur gesteigerten Expression diverser Transkriptionsfaktoren, die mit der Zellwand und deren Zusammensetzung/-synthese assoziiert sind<sup>11,55,80</sup>. Um dieser Hypothese nachzugehen wäre es nötig, die erhöhte Phosphorylierung von MpKA bei Überexpression von *rho2* mit einem entsprechenden Assay nachzuweisen. Solche Phosphorylierungsnachweise von MpKA sind bereits erfolgreich angewandt worden<sup>80</sup>.

Eine weitere hypothetische Funktion von Rho2 wäre die direkte oder indirekte Aktivierung von Zellwandsyntheseproteinen, bspw. der Glucan-Synthasen oder von Chitin-Synthasen. Es gibt Hinweise aus der Pilzforschung, dass Rho2 mit der  $\alpha$ -1,3-Glucan Synthese assoziiert ist: Im Hefepilz *Saccharomyces Pombe* führt eine Überexpression zu einer Erhöhung von  $\alpha$ -1,3-Glucan, nicht aber von  $\beta$ -1,3-Glucan<sup>197</sup>. Diese Erhöhung ist abhängig vom Proteinkinase C Homolog Pck2, welche ein MAP-Kinase Modul aktiviert, welches wiederum als Aktivator für diverse mit der Zellwandsynthese assoziierte Transkriptionsfaktoren dient (siehe 5.5)<sup>195,197</sup>. Dies ist ein Hinweis, dass ein Zusammenhang von Rho2 mit der  $\alpha$ -1,3-Glucan Synthese nicht über eine direkte Aktivierung, sondern über Genregulation Synthese-assoziiierter Gene besteht<sup>64</sup>.

Um der Hypothese einer Assoziation von Rho2 mit der Zellwandsynthese weiter nachzugehen, wären Deletionsanalysen hilfreich. Würde nach Deletion von Synthesegenen einzelner Zellwandbausteine eine Überexpression von *rho2* keine Auswirkung mehr auf Resistenzen gegenüber Zellwandstress haben, wäre dieser Baustein bzw. dessen Synthese/syntheseassoziierten Gene als Zieleffektor von *rho2* identifiziert. Ein Problem ist dabei, dass Zellwandbestandteile häufig von mehreren Synthasen gebildet werden, wodurch ein redundantes und komplexes System entsteht<sup>55</sup>. Entsprechende Deletionsanalysen sind somit durch die notwendige Mehrfachdeletion aufwendig. Eine Deletion von mehr als drei bis vier Zielgenen ist in

*A. fumigatus* aufgrund einer begrenzten verfügbaren Anzahl an zur Selektion verwendeten Antimykotika nur sehr schwierig möglich. Eine interessante Ausnahme bildet der Zellwandbaustein  $\beta$ -1,3-Glucan, welcher nur durch die Synthase Fks1 gebildet wird<sup>198,199,55</sup>. Die Mutante  $\Delta fks1$  (welche folglich kein  $\beta$ -1,3-Glucan bildet, wodurch der Zellwand ein sehr wesentlicher Baustein fehlt) ist jedoch kaum überlebensfähig: Sie wächst sehr langsam und verzweigt sich verstärkt mit konsekutiv verstärkter Septenbildung, um einen beobachteten vermehrten Integritätsverlust der Zellwand in Form von Aufplatzen zu kompensieren<sup>79</sup>. Damit befindet sich die Mutante  $\Delta fks1$  vermutlich dauerhaft in Stressbedingungen. Unter diesen Voraussetzungen erscheinen Experimente, welche Veränderungen der Zellwandstressresistenz unter Überexpressionsbedingungen von *rho2* beinhalten, wenig erfolgsversprechend.

Interessant wäre eine Untersuchung der genauen Zellwandzusammensetzung. Dadurch könnte untersucht werden, ob sich der quantitative Anteil an Chitin,  $\alpha$ -1,3-Glucan oder  $\beta$ -1,3-Glucan der Zellwand unter induzierten bzw. reprimierten Bedingungen von *rho2* ändert. Damit könnten wichtige Hinweise für mögliche Zieleffektoren von *rho2* gesammelt werden.

Sollte sich eine im Vergleich zum Wildtyp geänderte Zellwand ergeben, könnten im nächsten Schritt Versuche durchgeführt werden, in denen die Zytokin-Produktion von Immunzellen nach Exponierung mit Hyphen von *rho2<sub>tet</sub>* mit und ohne Zugabe von Doxycyclin im Vergleich zum Wildtyp gemessen wird. Ein Unterschied in der Menge oder Zusammensetzung der gebildeten Zytokine könnte weitere Rückschlüsse auf die Interaktion von Zellwand und Immunsystem zulassen. Würde sich etwa der Anteil von  $\alpha$ -1,3-Glucan erhöhen, würde die beobachtete erhöhte Resistenz von *rho2<sub>tet</sub>* Hyphen unter induzierten Bedingungen gegenüber PMNs der Hypothese zusprechen, dass das Zellwandpolymer  $\alpha$ -1,3-Glucan eine Art Tarnungsmechanismus des Pilzes darstellt (siehe auch 5.4)<sup>27,72,73</sup>. Sollte sich bei *rho2<sub>tet</sub>* Hyphen unter induzierten Bedingungen hingegen der Anteil an  $\beta$ -1,3-Glucan vermindern, ein für Immunzellen wichtiges PAMP<sup>63,64</sup>, wäre dies ebenfalls eine mögliche Erklärung für eine im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächte Immunantwort.

### 8.3.2 Rolle von MidA und Bezug zu Rho2

Der Zellwandsensor MidA ist Teil des Zellwandintegritätswegs und gibt Zellwandstress über Rom2, Rho1 und PkcA an Bck2/Mkk2/MpKA weiter<sup>11,12,78</sup>. Eine Deletion von MidA führt neben einer erhöhten Sensibilität gegenüber Zellwandstress wie beschrieben auch zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Immunkzellen wie bei  $\Delta rho2$ <sup>12</sup>. Denkbar wäre, dass MidA einen erheblichen Anteil seiner Stressdetektion und -antwort an Rho2 vermittelt. Dies bietet einen Ansatzpunkt für weitere Experimente: Neben einer Doppeldeletion  $\Delta midA \Delta rho2$  wäre auch eine konditionelle *midA*-Mutante hilfreich, um zu überprüfen, ob eine (starke) Expression von *midA* analog zu *rho2* zu einer erhöhten Zellwandstressresistenz führt. Wäre dies der Fall, würde dies für eine Rolle von MidA als Sensor vor Rho2 sprechen.

### 8.3.3 Rolle der 3'-UTR von *rho2* für die Regulation des Promoters

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine mehrfache Integration des Komplementationsvektors  $\Delta rho2 + rho2$  aller Wahrscheinlichkeit nach aufgrund einer konsekutiv erhöhten Expressionsrate von *rho2* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Zellwandstress führt. Überraschenderweise führte eine einfache Integration des Vektors nicht zu einer Reduktion der Resistenz auf Wildtypniveau. Die beobachtete erhöhte Resistenz gegenüber dem Zellwandstressor CFW erreichte das Wildtypniveau erst bei Komplementationsmutanten, welche zusätzlich eine Erweiterung am 3'-UTR in Form des neuen Komplementationsvektors pDR003 ( $\Delta rho2 + rho2_{add3}$ ) aufwiesen. Damit deutet vieles darauf hin, dass die 3'-UTR von *rho2* eine regulatorische Funktion auf die Genexpression aufweist.

Auf prätranskriptioneller Ebene wäre hypothetisch denkbar, dass in der 3'-UTR von *rho2* eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren sitzt<sup>200</sup>. Fehlt diese, wäre eine veränderte Genexpressionsrate wahrscheinlich. Nach der Transkription in mRNA ist in eukaryoten Zellen ein komplexes und auf mehreren Mechanismen beruhendes regulatorisches System beschrieben, in welchem die 3'-UTR wichtige Funktionen innehat<sup>201</sup>. Sie spielt beispielsweise eine Rolle bei der mRNA-Stabilität (maßgeblich durch AU-reiche Regionen und microRNA<sup>202,203</sup>), der Regulation der Translation (beispielsweise bei der Initiierung der Translation über RNA-bindende Proteine (RBPs)<sup>204,205</sup>) oder der mRNA-Lokalisation<sup>206</sup>. Viele der regulatorischen Mechanismen



der 3'-UTR beruht auf RBPs, welche wiederum weitere Effektorproteine binden können<sup>201</sup>. Auch der 3'-UTR von *rho2* könnte eine Bindungsstelle für solche Regulator-Proteine aufweisen.

Damit ergibt sich ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen: Mittels Analysen auf Proteinebene z.B. mittels Western-Blot könnte bestätigt werden, ob die Erweiterung an der 3'-UTR bzw. deren Fehlen zu einer geänderten Expressionsrate führt. Für die Frage, welcher Teil der 3'-UTR für die mutmaßlich geänderte Expression von Rho2 verantwortlich ist, könnte die Konstruktion neuer Vektoren mit stückweiser Verkürzung des um 1009bp am 3'-Bereich erweiterten Vektors pDR003 Aufschluss geben.

### **8.3.4 *In vivo* Versuche**

Ein *in vivo* Infektionsmodell in der Bienenmade *Galleria melonella* zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Überlebensrate von mit  $\Delta\rho2$  infizierten Maden, was für eine verminderte Virulenz des Stammes  $\Delta\rho2$  spricht. Leider im Vergleich zu Wildtyp keinen signifikanten Überlebensunterschied zeigte die Infektion mit  $\Delta\rho2+\rho2$ , obwohl diese *in vitro* eine erhöhte Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten aufweist. Möglicherweise führt eine Überexpression von *rho2* durch ein verlangsamtes Wachstum zu einer gleichermaßen reduzierten Virulenz, obwohl eine erhöhte Resistenz gegenüber Immunzellen besteht. Als möglicher Störfaktor kommt zudem eine zu hohe Abtötungsrate des Wildtyps in Betracht: Am Ende der Infektionsphase überlebten lediglich knapp 10% der Tiere, die Überlebenskurve sinkt früh steil ab. Eine Wiederholung der Experimente mit niedrigerer Infektionslast mit dem Ziel eines höheren Überlebens der mit Wildtyp beimpften Maden wäre ein möglicher nächster Schritt. Ergänzend könnte auch die konditionelle Mutante *rho2<sub>tet</sub>* im Madenmodell untersucht werden. Nötig hierzu sind sicherlich einige entsprechende Vorversuche, in denen sichergestellt wird, dass eine starke Expression in der Made erreicht wird, da die nötige Zufuhr von Doxycyclin (etwa durch Fütterung oder mehrfache Bolusgaben per Injektion) ein methodisches Problem darstellt. Zur Vortestung könnte ein konditioneller Stamm mitgeführt werden, welcher ohne Zugabe von Doxycyclin avirulent ist. Bei signifikanter Abtötungsrate der Maden vergleichbar mit dem Wildtyp wäre von einer suffizienten Doxycyclinversorgung auszugehen.

Zwar stellt das Infektionsmodell *Galleria melonella* ein etabliertes *in vivo* Modell in der Pilzforschung dar<sup>69,207</sup>, dennoch wäre ein *in vivo* Infektionsversuch an Säugetieren wie klassischerweise dem Mausmodell eine wertvolle Ergänzung dieser Daten, um deren Relevanz und mögliche Übertragbarkeit auf die Infektion im Menschen zu überprüfen. Es gibt Evidenz, dass ein intakter Zellwandintegritätsweg für die Virulenz von *A. fumigatus* erforderlich ist. Eine Deletion von *mkk2*, einem von drei Elementen des MAP-Kinase-Wegs über Bck2, MpkA, und Mkk2 führt zu einer verminderten Virulenz im Mausmodell<sup>80</sup>. Überraschenderweise führt eine Deletion von *mpkA* zwar zu einem *in vitro* drastischen Wachstumsdefekt vergleichbar mit dem von  $\Delta mkk2$ , jedoch konnte keine verminderte Virulenz festgestellt werden<sup>55</sup>. Auch eine Punktmutation der den MAP-Kinasen Bck2/MpkA/Mkk2 direkt vorgeschalteten Proteinkinase PkcA führt bisherigen Erkenntnissen nach nicht zu einer reduzierten Virulenz<sup>55,82</sup>. Wertvoll wären deshalb weitere Erkenntnisse, ob Rho2 auch im Mausmodell einen Einfluss auf die Virulenz von *A. fumigatus* aufweist.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass über die Rolle des Zellwandintegritätswegs für die Virulenz in *in vivo* Infektionsmodellen bisher wenig bekannt ist<sup>1,55</sup>. Weitere Untersuchungen könnten einen wertvollen Beitrag dazu leisten, die Rolle des Zellwandintegritätswegs für Resistenz und Virulenz *in vivo* besser zu verstehen und mögliche Schlüsselstellen zu identifizieren, welche wiederum Ausgangspunkt für Anwendungen wie die Überprüfung möglicher Ziele neuer medikamentöser Wirkstoffe bieten könnten.

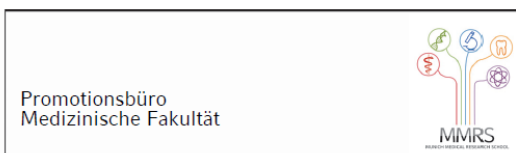
## 9 Publikationen

Aus dieser Dissertationsschrift ist eine Publikation in einem internationalem Fachjournal hervorgegangen. Der Autor dieser Dissertationsschrift ist dabei der Erstautor der Arbeit. Der Titel der Publikation lautet „Mitochondrial Fragmentation in *Aspergillus fumigatus* as Early Marker of Granulocyte Killing Activity“ und ist am 14.05.2018 im Journal *Frontiers of cellular and infection microbiology* erschienen<sup>178</sup>. Darin veröffentlicht wurde der erste Teil dieser Arbeit (vor allem Kapitel 7.1.1 bis 7.1.7).

Die im Rahmen dieser Dissertationsschrift entwickelte und charakterisierte Methode *mitoFLARE* fand Anwendung in einem entscheidendem Experiment der Arbeit mit dem Titel „Peroxiredoxin Asp f3 is Essential for *Aspergillus fumigatus* to overcome iron limitation during Infection“<sup>208</sup>. Die Arbeit ist am 31.08.2021 im Journal *mBio* erschienen. Der Autor dieser Dissertationsschrift ist dabei Ko-Autor.

Eine weitere Publikation ist aktuell in Arbeit.

## 10 Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Ruf, Dominik

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Rolle des Zellwandintegritätswegs in *Aspergillus fumigatus* für Sensibilität und Resistenz gegenüber neutrophilen Granulozyten - Analyse mittels mitochondrialer Morphologie als Stressmarker“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.11.2021

Dominik Ruf

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## 11 Danksagung

Sechs Jahre sind nun vergangen, seitdem ich die experimentelle Arbeit an dieser Dissertation im Max-von-Pettenkofer Institut der LMU begonnen habe. Vor allem die ersten dreieinhalb Jahre, die ich teils in Voll-, teils in Teilzeit neben dem Studium im Labor verbrachte, waren sehr prägend für mich und ich blicke insgesamt sehr positiv auf die erlebten Erfahrungen zurück. Neben den vielen lieben Kollegen, zu denen ich bis heute teils engen Kontakt halte, lernte ich intensiv kennen, was medizinische experimentelle Forschung bedeutet: Akribisches Planen, das Achten auf Details, die kritische Diskussion der Ergebnisse, die oft nötige Frustrationstoleranz bei fehlgeschlagenen Experimenten.

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Johannes Wagener sowie meinem Betreuer Herrn Dr. Karl Dichtl. Beide waren stets für mich da und schnell zur Hilfe, wenn es Probleme gab – auch in den Jahren nach Abschluss der eigentlichen Experimente. Zudem danke ich den bereits erwähnten Teammitgliedern der Arbeitsgruppe, welche mich die Jahre im Labor auch als eine lustige und lockere Zeit in Erinnerung behalten lassen. Bei Kummer und Sorgen half mir auch meine Familie, welcher ich herzlich danke.

## 12 Literaturverzeichnis

1. Latgé, J.-P. & Chamilos, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, (2019).
2. Marr, K. A., Carter, R. A., Boeckh, M., Martin, P. & Corey, L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* **100**, 4358–4366 (2002).
3. Fraser, D. W., Ward, J. I., Ajello, L. & Plikaytis, B. D. Aspergillosis and other systemic mycoses. The growing problem. *JAMA* **242**, 1631–1635 (1979).
4. Kume, H. *et al.* Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. *Med. Mycol. J.* **52**, 117–127 (2011).
5. Robin, C. *et al.* Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **25**, 354–361 (2019).
6. Pagano, L. *et al.* The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **91**, 1068–1075 (2006).
7. Espinosa, V. & Rivera, A. First Line of Defense: Innate Cell-Mediated Control of Pulmonary Aspergillosis. *Front. Microbiol.* **7**, 272 (2016).
8. Mircescu, M. M., Lipuma, L., van Rooijen, N., Pamer, E. G. & Hohl, T. M. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Infect. Dis.* **200**, 647–656 (2009).
9. Neubauer, M. *et al.* Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications. *Mol. Microbiol.* **98**, 930–945 (2015).

10. Geißel, B., Penka, M., Neubauer, M. & Wagener, J. The ER-mitochondria encounter structure contributes to hyphal growth, mitochondrial morphology and virulence of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **307**, 37–43 (2017).
11. Dichtl, K., Samantaray, S. & Wagener, J. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell. Microbiol.* **18**, 1228–1238 (2016).
12. Dichtl, K., Helmschrott, C., Dirr, F. & Wagener, J. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases: Cell wall integrity sensors and relevant Rho GTPases of *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **83**, 506–519 (2012).
13. Patterson, T. F. *et al.* Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **63**, e1–e60 (2016).
14. Walsh, T. J. *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **46**, 327–360 (2008).
15. Latgé, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310–350 (1999).
16. Kosmidis, C. & Denning, D. W. Republished: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Postgrad. Med. J.* **91**, 403–410 (2015).
17. Lortholary, O. *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIIF network (2005-2007). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 1882–1889 (2011).
18. Fukuda, T. *et al.* Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood* **102**, 827–833 (2003).
19. Denning, D. W., Pleuvry, A. & Cole, D. C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull. World Health Organ.* **89**, 864–872 (2011).

20. Denning, D. W. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* **47**, 45–68 (2016).
21. Geiser, D. M. *et al.* The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **59**, 1–10 (2007).
22. Sugui, J. A., Kwon-Chung, K. J., Juvvadi, P. R., Latgé, J.-P. & Steinbach, W. J. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a019786 (2014).
23. Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Ishi, K. & Kitamoto, K. Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1081–1088 (2005).
24. Beck, J. & Ebel, F. Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **303**, 90–97 (2013).
25. Aimaganianda, V. *et al.* Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **460**, 1117–1121 (2009).
26. Kwon-Chung, K. J. & Sugui, J. A. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog.* **9**, e1003743 (2013).
27. Latgé, J.-P. & Beauvais, A. Functional duality of the cell wall. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**, 111–117 (2014).
28. Reichle, R. E. & Alexander, J. V. MULTIPERFORATE SEPTATIONS, WORONIN BODIES, AND SEPTAL PLUGS IN *FUSARIUM*. *J. Cell Biol.* **24**, 489–496 (1965).
29. O’Gorman, C. M., Fuller, H. T. & Dyer, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471–474 (2009).
30. Dyer, P. S. & Paoletti, M. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med. Mycol.* **43 Suppl 1**, S7-14 (2005).



31. Ashton, G. D. & Dyer, P. S. Culturing and Mating of *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Protoc. Microbiol.* **54**, e87 (2019).
32. Ascioglu, S. *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **34**, 7–14 (2002).
33. Muñoz, P. *et al.* The isolation of *Aspergillus fumigatus* from respiratory tract specimens in heart transplant recipients is highly predictive of invasive aspergillosis. *Transplantation* **75**, 326–329 (2003).
34. Horvath, J. A. & Dummer, S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Med.* **100**, 171–178 (1996).
35. Ullmann, A. J. *et al.* Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24 Suppl 1**, e1–e38 (2018).
36. Kuhlman, J. E., Fishman, E. K. & Siegelman, S. S. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. *Radiology* **157**, 611–614 (1985).
37. Greene, R. E. *et al.* Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **44**, 373–379 (2007).
38. Francis, P. *et al.* Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. *J. Infect. Dis.* **169**, 356–368 (1994).
39. Herbrecht, R. *et al.* *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**, 1898–1906 (2002).
40. Maertens, J., Verhaegen, J., Lagrou, K., Van Eldere, J. & Boogaerts, M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged

- neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* **97**, 1604–1610 (2001).
41. Marr, K. A. *et al.* Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J. Infect. Dis.* **190**, 641–649 (2004).
42. Stynen, D., Goris, A., Sarfati, J. & Latgé, J. P. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 497–500 (1995).
43. Kovanda, L. L., Desai, A. V. & Hope, W. W. Prognostic value of galactomannan: current evidence for monitoring response to antifungal therapy in patients with invasive aspergillosis. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **44**, 143–151 (2017).
44. Miceli, M. H. & Maertens, J. Role of Non-Culture-Based Tests, with an Emphasis on Galactomannan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **36**, 650–661 (2015).
45. Lehrnbecher, T., Hassler, A., Groll, A. H. & Bochennek, K. Diagnostic Approaches for Invasive Aspergillosis-Specific Considerations in the Pediatric Population. *Front. Microbiol.* **9**, 518 (2018).
46. Kwak, E. J. *et al.* Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 435–438 (2004).
47. Husain, S. *et al.* Prospective assessment of Platelia Aspergillus galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **4**, 796–802 (2004).
48. Sulahian, A., Touratier, S. & Ribaud, P. False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2366–2367 (2003).

49. Singh, N. *et al.* Reactivity of platelia Aspergillus galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1989–1992 (2004).
50. Adam, O. *et al.* Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive Aspergillus galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38**, 917–920 (2004).
51. Hoenigl, M. *et al.* Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2039–2045 (2014).
52. Xiao, W. *et al.* Sputum signatures for invasive pulmonary aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases (SPARED): study protocol for a prospective diagnostic trial. *BMC Infect. Dis.* **18**, 271 (2018).
53. Rath, P.-M. & Steinmann, J. Overview of Commercially Available PCR Assays for the Detection of Aspergillus spp. DNA in Patient Samples. *Front. Microbiol.* **9**, 740 (2018).
54. Boucher, H. W., Groll, A. H., Chiou, C. C. & Walsh, T. J. Newer systemic antifungal agents : pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs* **64**, 1997–2020 (2004).
55. Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M. & Brakhage, A. A. The Aspergillus fumigatus cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front. Microbiol.* **6**, 325 (2015).
56. Anderson, T. M. *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 400–406 (2014).
57. Herbrecht, R. *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 408–415 (2002).
58. Cornet, M. *et al.* Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *J. Hosp. Infect.* **51**, 288–296 (2002).

59. Martino, R. *et al.* Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Br. J. Haematol.* **116**, 475–482 (2002).
60. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *N. Engl. J. Med.* **324**, 509–516 (1991).
61. Fontaine, null *et al.* Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of aspergillus fumigatus cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 41528 (2000).
62. Fontaine, T. *et al.* Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002372 (2011).
63. Latgé, J.-P. Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**, 863–872 (2010).
64. Wagener, J., Striegler, K. & Wagener, N.  $\alpha$ - and  $\beta$ -1,3-Glucan Synthesis and Remodeling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **425**, 53–82 (2020).
65. Da Silva, C. A. *et al.* Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 3573–3582 (2009).
66. Villiers, C. *et al.* From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 1252–1264 (2009).
67. Tsoni, S. V. & Brown, G. D. beta-Glucans and dectin-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 45–60 (2008).
68. Wüthrich, M., Deepe, G. S. & Klein, B. Adaptive immunity to fungi. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 115–148 (2012).
69. Gazendam, R. P. *et al.* Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 1272–1283 (2016).

70. Werner, J. L. *et al.* Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 4938–4946 (2009).
71. Adams, E. L. *et al.* Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 115–123 (2008).
72. Rappleye, C. A. & Goldman, W. E. Fungal stealth technology. *Trends Immunol.* **29**, 18–24 (2008).
73. Beauvais, A. *et al.* Deletion of the  $\alpha$ -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **9**, e1003716 (2013).
74. Lamaris, G. A. *et al.* Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *J. Infect. Dis.* **198**, 186–192 (2008).
75. Beyda, N. D., Liao, G., Endres, B. T., Lewis, R. E. & Garey, K. W. Innate inflammatory response and immunopharmacologic activity of micafungin, caspofungin, and voriconazole against wild-type and FKS mutant *Candida glabrata* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5405–5412 (2015).
76. Levin, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175 (2011).
77. Richthammer, C. *et al.* RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **85**, 716–733 (2012).
78. Bermejo, C. *et al.* Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Omics J. Integr. Biol.* **14**, 679–688 (2010).
79. Dichtl, K. *et al.* *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall  $\beta$ -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Mol. Microbiol.* **95**, 458–471 (2015).

80. Dirr, F. *et al.* AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **300**, 496–502 (2010).
81. Samantaray, S., Neubauer, M., Helmschrott, C. & Wagener, J. Role of the guanine nucleotide exchange factor Rom2 in cell wall integrity maintenance of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **12**, 288–298 (2013).
82. Rocha, M. C. *et al.* The *Aspergillus fumigatus* pkcA G579R Mutant Is Defective in the Activation of the Cell Wall Integrity Pathway but Is Dispensable for Virulence in a Neutropenic Mouse Infection Model. *PloS One* **10**, e0135195 (2015).
83. Harris, S. D. Cdc42/Rho GTPases in fungi: variations on a common theme. *Mol. Microbiol.* **79**, 1123–1127 (2011).
84. Kwon, M. J. *et al.* Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Mol. Microbiol.* **79**, 1151–1167 (2011).
85. Ridley, A. J. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471–477 (2001).
86. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522–529 (2006).
87. Park, H.-O. & Bi, E. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **71**, 48–96 (2007).
88. Scott, B. & Eaton, C. J. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 488–493 (2008).
89. Hordijk, P. L. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ. Res.* **98**, 453–462 (2006).

90. Benitah, S. A., Valerón, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J. & Lacal, J. C. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1705**, 121–132 (2004).
91. Levin, D. E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **69**, 262–291 (2005).
92. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–884 (2010).
93. Detmer, S. A. & Chan, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 870–879 (2007).
94. Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1–63 (1990).
95. Zhao, J., Lendahl, U. & Nistér, M. Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 951–976 (2013).
96. Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. & Westermann, B. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20150–20155 (1998).
97. Hermann, G. J. *et al.* Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* **143**, 359–373 (1998).
98. Meeusen, S. *et al.* Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**, 383–395 (2006).
99. Wong, E. D. *et al.* The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* **151**, 341–352 (2000).
100. Otsuga, D. *et al.* The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* **143**, 333–349 (1998).
101. Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. & van der Bliek, A. M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* **143**, 351–358 (1998).

102. Tieu, Q. & Nunnari, J. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* **151**, 353–366 (2000).
103. Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. & Shaw, J. M. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* **151**, 367–380 (2000).
104. Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R. & Bossy-Wetzel, E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 505–518 (2008).
105. Cho, D.-H. *et al.* S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* **324**, 102–105 (2009).
106. Tekaiia, F. & Latgé, J.-P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 385–392 (2005).
107. Wéry, N. Bioaerosols from composting facilities--a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 42 (2014).
108. Osharov, N. Interaction of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* with lung epithelial cells. *Front. Microbiol.* **3**, 346 (2012).
109. Bertuzzi, M. *et al.* Anti-*Aspergillus* Activities of the Respiratory Epithelium in Health and Disease. *J. Fungi Basel Switz.* **4**, (2018).
110. Wasylanka, J. A. & Moore, M. M. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 1579–1587 (2003).
111. Eisenstein, D. J., Biddinger, P. W. & Rhodes, J. C. Experimental murine invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **93**, 510–515 (1990).
112. Paris, S. *et al.* Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.* **65**, 1510–1514 (1997).



113. Kerr, S. C. *et al.* FleA Expression in *Aspergillus fumigatus* Is Recognized by Fucosylated Structures on Mucins and Macrophages to Prevent Lung Infection. *PLoS Pathog.* **12**, e1005555 (2016).
114. Amitani, R. *et al.* Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect. Immun.* **63**, 3266–3271 (1995).
115. He, Q. *et al.* Pentraxin 3 Gene Polymorphisms and Pulmonary Aspergillosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **66**, 261–267 (2018).
116. Garlanda, C. *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* **420**, 182–186 (2002).
117. Dagenais, T. R. T. & Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 447–465 (2009).
118. Ibrahim-Granet, O. *et al.* Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **71**, 891–903 (2003).
119. Philippe, B. *et al.* Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun.* **71**, 3034–3042 (2003).
120. Carrion, S. de J. *et al.* The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 2581–2588 (2013).
121. Morgenstern, D. E., Gifford, M. A., Li, L. L., Doerschuk, C. M. & Dinanuer, M. C. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.* **185**, 207–218 (1997).

122. Guerra, E. S. *et al.* Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma. *PLoS Pathog.* **13**, e1006175 (2017).
123. Kamaï, Y., Lossinsky, A. S., Liu, H., Sheppard, D. C. & Filler, S. G. Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* **11**, 170–182 (2009).
124. Rødland, E. K. *et al.* Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infect. Immun.* **78**, 1269–1275 (2010).
125. Morrison, B. E., Park, S. J., Mooney, J. M. & Mehrad, B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1862–1870 (2003).
126. Espinosa, V. *et al.* Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity. *Sci. Immunol.* **2**, (2017).
127. Carvalho, A. *et al.* TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. *Blood* **119**, 967–977 (2012).
128. Hebart, H. *et al.* Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* **100**, 4521–4528 (2002).
129. Beck, O. *et al.* Generation of highly purified and functionally active human TH1 cells against *Aspergillus fumigatus*. *Blood* **107**, 2562–2569 (2006).
130. Perruccio, K. *et al.* Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* **106**, 4397–4406 (2005).
131. Cenci, E. *et al.* T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 381–388 (2000).

132. De Luca, A. *et al.* CD4(+) T cell vaccination overcomes defective cross-presentation of fungal antigens in a mouse model of chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **122**, 1816–1831 (2012).
133. Zelante, T. *et al.* CD103(+) Dendritic Cells Control Th17 Cell Function in the Lung. *Cell Rep.* **12**, 1789–1801 (2015).
134. Dewi, I. M. W., van de Veerdonk, F. L. & Gresnigt, M. S. The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi Basel Switz.* **3**, (2017).
135. Bacher, P. *et al.* Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **176**, 1340-1355.e15 (2019).
136. Bacher, P. *et al.* Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell* **167**, 1067-1078.e16 (2016).
137. Torosantucci, A. *et al.* A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J. Exp. Med.* **202**, 597–606 (2005).
138. Becker, K. L. *et al.* Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **45**, 423–437 (2015).
139. Segal, A. W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 197–223 (2005).
140. Holmes, B., Page, A. R. & Good, R. A. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.* **46**, 1422–1432 (1967).
141. Thrasher, A. J., Keep, N. H., Wientjes, F. & Segal, A. W. Chronic granulomatous disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1227**, 1–24 (1994).
142. Bonnett, C. R., Cornish, E. J., Harmsen, A. G. & Burritt, J. B. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect. Immun.* **74**, 6528–6539 (2006).

143. Reeves, E. P. *et al.* Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* **416**, 291–297 (2002).
144. Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503–3521 (1997).
145. Feldmesser, M. Role of neutrophils in invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* **74**, 6514–6516 (2006).
146. Leal, S. M. *et al.* Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *J. Clin. Invest.* **122**, 2482–2498 (2012).
147. Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N. & Latge, J.-P. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **75**, 910–923 (2010).
148. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
149. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 577–582 (2007).
150. Caffrey, A. K. *et al.* IL-1 $\alpha$  signaling is critical for leukocyte recruitment after pulmonary *Aspergillus fumigatus* challenge. *PLoS Pathog.* **11**, e1004625 (2015).
151. Jhingran, A. *et al.* Compartment-specific and sequential role of MyD88 and CARD9 in chemokine induction and innate defense during respiratory fungal infection. *PLoS Pathog.* **11**, e1004589 (2015).
152. Clark, H. L. *et al.* Protein Deiminase 4 and CR3 Regulate *Aspergillus fumigatus* and  $\beta$ -Glucan-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation, but Hyphal Killing Is Dependent Only on CR3. *Front. Immunol.* **9**, 1182 (2018).
153. Tkalcovic, J. *et al.* Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* **12**, 201–210 (2000).

154. Leal, S. M. *et al.* Targeting iron acquisition blocks infection with the fungal pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog.* **9**, e1003436 (2013).
155. Zarembek, K. A., Sugui, J. A., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J. & Gallin, J. I. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 6367–6373 (2007).
156. Roilides, E., Uhlig, K., Venzon, D., Pizzo, P. A. & Walsh, T. J. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect. Immun.* **61**, 1185–1193 (1993).
157. Jhingran, A. *et al.* Tracing conidial fate and measuring host cell antifungal activity using a reporter of microbial viability in the lung. *Cell Rep.* **2**, 1762–1773 (2012).
158. Clark, H. L. *et al.* Zinc and Manganese Chelation by Neutrophil S100A8/A9 (Calprotectin) Limits Extracellular *Aspergillus fumigatus* Hyphal Growth and Corneal Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 336–344 (2016).
159. Sturtevant, J. & Latgé, J. P. Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J. Infect. Dis.* **166**, 580–586 (1992).
160. Bruns, S. *et al.* Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* **6**, e1000873 (2010).
161. McCormick, A. *et al.* NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* **12**, 928–936 (2010).
162. Schmid, E. N. Ultrastructure and viability of *E. coli* treated fosfomycin. *Zentralblatt Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe Med. Mikrobiol. Parasitol.* **245**, 48–54 (1979).
163. Phuong, N. N. M., Le, T. T., Van Camp, J. & Raes, K. Evaluation of antimicrobial activity of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extracts. *Int. J. Food Microbiol.* **321**, 108539 (2020).

164. Fontaine, T. *et al.* Cell wall alpha1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **47**, 707–712 (2010).
165. Prüfer, S. *et al.* Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of *Aspergillus fumigatus* pneumonia in mice. *Immunobiology* **219**, 87–96 (2014).
166. Lupetti, A., van Dissel, J. T., Brouwer, C. P. J. M. & Nibbering, P. H. Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **27**, 1125–1129 (2008).
167. Slesiona, S. *et al.* Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PloS One* **7**, e31223 (2012).
168. Liao, R. S., Rennie, R. P. & Talbot, J. A. Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1034–1041 (1999).
169. Akoumianaki, T. *et al.* *Aspergillus* Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell Host Microbe* **19**, 79–90 (2016).
170. Heung, L. J., Jhingran, A. & Hohl, T. M. Deploying FLAREs to Visualize Functional Outcomes of Host-Pathogen Encounters. *PLoS Pathog.* **11**, e1004912 (2015).
171. Jhingran, A., Kasahara, S. & Hohl, T. M. Flow Cytometry of Lung and Bronchoalveolar Lavage Fluid Cells from Mice Challenged with Fluorescent *Aspergillus* Reporter (FLARE) Conidia. *Bio-Protoc.* **6**, (2016).
172. Maselli, A., Laevsky, G. & Knecht, D. A. Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol. Read. Engl.* **148**, 413–420 (2002).
173. Hill, T. W. & Kafer, E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genet. Rep.* **48**, 20–21 (2001).

174. Krappmann, S., Sasse, C. & Braus, G. H. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot. Cell* **5**, 212–215 (2006).
175. Helmschrott, C., Sasse, A., Samantaray, S., Krappmann, S. & Wagener, J. Upgrading fungal gene expression on demand: improved systems for doxycycline-dependent silencing in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1751–1754 (2013).
176. Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemanse, M. A., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117–124 (1987).
177. Monteiro, M. C. *et al.* A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J. Biomol. Screen.* **17**, 542–549 (2012).
178. Ruf, D., Brantl, V. & Wagener, J. Mitochondrial Fragmentation in *Aspergillus fumigatus* as Early Marker of Granulocyte Killing Activity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 128 (2018).
179. Andonegui, G., Goyert, S. M. & Kubes, P. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 2111–2119 (2002).
180. Chen, Y. *et al.* Tumour necrosis factor- $\alpha$  stimulates human neutrophils to release preformed activin A. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 889–896 (2011).
181. Cao, C. *et al.* Toll-like receptor 4 deficiency increases resistance in sepsis-induced immune dysfunction. *Int. Immunopharmacol.* **54**, 169–176 (2018).
182. Xu, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27**, 135–144 (2007).
183. Geißel, B. *et al.* Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Commun.* **9**, 3098 (2018).

184. Loiko, V. & Wagener, J. The Paradoxical Effect of Echinocandins in *Aspergillus fumigatus* Relies on Recovery of the  $\beta$ -1,3-Glucan Synthase Fks1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
185. Kroll, K. *et al.* Identification of hypoxia-inducible target genes of *Aspergillus fumigatus* by transcriptome analysis reveals cellular respiration as an important contributor to hypoxic survival. *Eukaryot. Cell* **13**, 1241–1253 (2014).
186. Abgerufen Online auf fungidb.org aus öffentlich verfügbaren RNA-Seq Daten. Datum des Abrufs: 14.01.2021. Link:  
[https://fungidb.org/fungidb/app/jbrowse?loc=Chr3\\_A\\_fumigatus\\_Af293%3A2677737..2679628&data=%2Ffungidb%2Fservice%2Fjbrowse%2Ftracks%2FafumAf293&tracks=gene%2CRNA-Seq%20Evidence%20for%20Introns%2CafumAf293\\_Hillman\\_lowOxygen\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Hillman\\_lowOxygen\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Hagiwara\\_CompTranscHyphaeConidia\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Irmer\\_Blood\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Irmer\\_Blood\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Hagiwara\\_CompTranscHyphaeConidia\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Kurucz\\_OxidativeAndIronStresses\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Kurucz\\_OxidativeAndIronStresses\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Lind\\_SecondaryMetabolism\\_Afum\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Lind\\_SecondaryMetabolism\\_Afum\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Losada\\_normoxia\\_hypoxia\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Losada\\_normoxia\\_hypoxia\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Furukawa\\_Itraconazole\\_Response\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Furukawa\\_Itraconazole\\_Response\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293\\_Bowyer\\_itraconazole\\_resistance\\_rnaSeq\\_RSRC%2CafumAf293\\_Bowyer\\_itraconazole\\_resistance\\_rnaSeq\\_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only&highlight=.](https://fungidb.org/fungidb/app/jbrowse?loc=Chr3_A_fumigatus_Af293%3A2677737..2679628&data=%2Ffungidb%2Fservice%2Fjbrowse%2Ftracks%2FafumAf293&tracks=gene%2CRNA-Seq%20Evidence%20for%20Introns%2CafumAf293_Hillman_lowOxygen_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Hillman_lowOxygen_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Hagiwara_CompTranscHyphaeConidia_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Irmer_Blood_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Irmer_Blood_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Hagiwara_CompTranscHyphaeConidia_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Kurucz_OxidativeAndIronStresses_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Kurucz_OxidativeAndIronStresses_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Lind_SecondaryMetabolism_Afum_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Lind_SecondaryMetabolism_Afum_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Losada_normoxia_hypoxia_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Losada_normoxia_hypoxia_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Furukawa_Itraconazole_Response_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Furukawa_Itraconazole_Response_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only%2CafumAf293_Bowyer_itraconazole_resistance_rnaSeq_RSRC%2CafumAf293_Bowyer_itraconazole_resistance_rnaSeq_RSRC%20Density%20-%20Unique%20Only&highlight=)



187. Gazendam, R. P. *et al.* Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood* **124**, 590–597 (2014).
188. Marr, K. A., Koudadoust, M., Black, M. & Balajee, S. A. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 1240–1247 (2001).
189. Lass-Flörl, C. *et al.* Studies of in vitro activities of voriconazole and itraconazole against *Aspergillus* hyphae using viability staining. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 124–128 (2001).
190. Steele, C. *et al.* The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **1**, e42 (2005).
191. Girmenia, C. *et al.* Fusarium infections in patients with severe aplastic anemia: review and implications for management. *Haematologica* **84**, 114–118 (1999).
192. Azbarova, A. V., Galkina, K. V., Sorokin, M. I., Severin, F. F. & Knorre, D. A. The contribution of *Saccharomyces cerevisiae* replicative age to the variations in the levels of Trx2p, Pdr5p, Can1p and Idh isoforms. *Sci. Rep.* **7**, 13220 (2017).
193. Köhler, J. R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A. & Perfect, J. R. Fungi that Infect Humans. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
194. Balajee, S. A. *Aspergillus terreus* complex. *Med. Mycol.* **47 Suppl 1**, S42-46 (2009).
195. Rocha, M. C. *et al.* *Aspergillus fumigatus* MADS-Box Transcription Factor rlmA Is Required for Regulation of the Cell Wall Integrity and Virulence. *G3 Bethesda Md* **6**, 2983–3002 (2016).
196. Moreno, M. A. *et al.* The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol. Microbiol.* **64**, 1182–1197 (2007).
197. Calonge, T. M. *et al.* *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4393–4401 (2000).
198. Beauvais, A. *et al.* Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.* **183**, 2273–2279 (2001).

199. Cortés, J. C. G., Curto, M.-Á., Carvalho, V. S. D., Pérez, P. & Ribas, J. C. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 107352 (2019).
200. Lee, T. I. & Young, R. A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 77–137 (2000).
201. Mayr, C. Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu. Rev. Genet.* **51**, 171–194 (2017).
202. Barreau, C., Paillard, L. & Osborne, H. B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* **33**, 7138–7150 (2005).
203. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
204. Castelli, L. M. *et al.* The 4E-BP Caf20p Mediates Both eIF4E-Dependent and Independent Repression of Translation. *PLoS Genet.* **11**, e1005233 (2015).
205. Crawford, R. A. & Pavitt, G. D. Translational regulation in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **36**, 5–21 (2019).
206. Martin, K. C. & Ephrussi, A. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719–730 (2009).
207. Losada, L. *et al.* Large-scale transcriptional response to hypoxia in *Aspergillus fumigatus* observed using RNAseq identifies a novel hypoxia regulated ncRNA. *Mycopathologia* **178**, 331–339 (2014).
208. Brantl, V. *et al.* Peroxiredoxin Asp f3 Is Essential for *Aspergillus fumigatus* To Overcome Iron Limitation during Infection. *mBio* **12**, e0097621 (2021).